UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GH. ASACHI" IAŞI
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ

Conf.univ.dr. I.ŞT. BONTAŞ

MICROBIOLOGIE INDUSTRIALĂ

U IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C U P R I N S

Pag.

INTRODUCERE SI ISTORIC..... 12
CAP.I. NORME GENERALE DE NOMENCLATURA MICROBIANA..... 17
1. Izolarea şi identificarea microorganismelor 17
1.1.Prelevarea probelor..... 17
1.2.Lucrări pregătitoare în laborator..... 18
1.3.Obţinerea microorganismelor de interes industrial..... 19
2. Clasificarea microorganismelor..... 23
2.1.Tipuri de organizare celulară la microorganisme..... 23
2.2.Principii taxonomice în clasificarea microorganismelor..... 25
CAP.II.BIOLOGIA MICROORGANISMELOR DE INTERES INDUSTRIAL
B A C T E R I I L E
1.Tipul generic de bacterii..... 28
1.1.Morfologia bacteriilor..... 30
1.2.Proprietăţi fizice..... 31
1.3.Ultrastructura celulei bacteriene..... 32
1.3.1.Peretele celular..... 33
1.3.2.Spaţiul periplasmatic..... 37
1.3.3.Membrana plasmatică..... 37
1.3.4.Mezosomii..... 39
1.3.5.Citoplasma..... 40
1.3.6."Nucleul"..... 41
1.3.7.Ribosomii..... 42
1.3.8.Incluziuni citoplasmatice..... 44
1.3.9.Vacuolele..... 45
1.3.10.Cromatoforii..... 45
1.3.11.Sporul bacterian..... 45
1.3.12.Capsula şi stratul mucos..... 48
1.3.13.Flagelii..... 49
1.3.14.Pilii şi fimbriile..... 50
2.Tipuri particulare de bacterii 50
2.1.Actinomicetele..... 51
2.1.1.Morfologia actinomicetelor..... 51
2.1.2.Structura internă a actinomicetelor 53

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.3.Formaţiuni sporale la actinomicete... 53
2.1.4.Fiziologie şi metabolism 55
2.1.5.Taxonomie.....?..... 56
2.2.Mixobacteriile..... 57
2.2.1.Morfologie..... 57
2.2.2.Multiplicarea şi ciclul de viaţă..... 58
2.2.3.Fiziologie şi metabolism..... 59

L E V U R I L E

1.Morfologie..... 60
2.Structura internă..... 60
3.Fiziologie şi metabolism..... 63
4.Taxonomie..... 63

F U N G I I

1.Structura internă..... 66
2.Formaţiuni sporale..... 67
3.Fiziologie şi metabolism..... 67
4.Taxonomie..... 68

CAP.III. COMPOZITIA CHIMICA A CELULEI MICROBIENE..... 69
1.Componenţi anorganici celulari..... 69
1.1.Apa..... 69
1.2.Substanţe minerale..... 70
2.Componenţi organici celulari..... 70
2.1.Proteinele..... 71
2.2.Lipidele..... 71
2.3.Glucidele..... 71
2.4.Acizii nucleici..... 72
2.5.Enzime microbiene..... 73
2.6.Vitaminele..... 75

CAP.IV. MULTIPLICAREA MICROORGANISMELOR..... 76
1.Multiplicarea la bacterii..... 76
2.Multiplicarea la levuri..... 77
3.Multiplicarea fungilor..... 79

CRESTEREA MICROORGANISMELOR..... 80
1.Viteza de creştere a microorganismelor sau evoluţia unei culturi microbiene..... 81
2.Indicatori ai creşterii microorganismelor..... 84
2.1.Rata de creştere..... 84
2.2.Numărul de generaţii..... 84
2.3.Timpul de generaţii..... 84

BCU IAŞI PETRU MAIOR UNIVERSITY LIBRARY

CAP.V. FIZIOLOGIA MICROORGANISMELOR DE INTERES INDUSRIAL.. SI PROCESELE LOR METABOLICE..... 87
1. Necesităţi nutritive..... 87
1.1.Bioelementele 87
1.2.Necesarul în oxigen..... 88
2.Surse nutritive..... 89
2.1.Surse de energie..... 89
2.2.Surse de carbon..... 9o
2.3.Surse de azot..... 91
3.Factori de creştere..... 92
4.Căi de conversie a surselor nutritive..... 92
4.1.Căi cetabolice..... 93
4.2.Căi anabolice..... 95
4.3.Căi amfibolice..... 96
4.4.Căi anapleotice..... 96
4.5.Importanţa practică a cunoaşterii exigenţelor nutritive..... 96
5.Procese metabolice la microorganisme..... 97
5.1.Procese catabolice..... 97
5.1.1.Catabolizarea substanţelor de natură glucidică---..... 98
5.1.1.1.Calea Embden-Meyerhol-Parnas... 98
5.1.1.2.Calea hexozomonofosfatului..... 1oo
5.1.1.3.Calea Entner-Doudoroff..... 1o1
5.1.1.4.Calea fosfocetolazei..... 1o3
5.1.1.5.Interconexiunea căilor de catabolizare a glucozei..... 1o4
5.1.1.6.Ciclul acizilor tricarboxilici. 1o5
5.1.1.7.Ciclul glioxilatului..... 1o7
5.1.2.Catabolizarea substanţelor proteice şi a aminoacizilor..... 1o8
5.1.2.1.Proteoliza..... 1o8
5.1.2.2.Catabolizarea aminoacizilor.... 1o9
5.1.3.Catabolizarea lipidelor de către microorganisme..... 11o
5.1.4.Procese energetice de catabolism la microorganisme..... 11
5.2.Procese de biosinteză la microorganisme..... 115
5.2.1.Biosinteza substanţelor de natură glucidică.....

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.2.2.Biosinteza acizilor organici..... 117
5.2.2.1.Biosinteza acidului itaconic... 118
5.2.2.2.Biosinteza acidului acetic..... 118
5.2.2.3.Biosinteza acidului lactic..... 119
5.2.2.4.Biosinteza acidului citric..... 120
5.2.2.5.Biosinteza acidului glucuronic.. 121
5.2.3.Biosinteza substanţelor de natură proteică..... 121
5.2.3.1.Biosinteza proteinelor şi enzimelor..... 121
5.2.3.2.Biosinteza aminoacizilor..... 127
5.2.3.2.1.Biosinteza aminoacizilor din familia glutamatului..... 128
5.2.3.2.2.Biosinteza aminoacizilor din familia aspartatului..... 129
5.2.3.2.3.Biosinteza aminoacizilor din familia aromatică..... 130
5.2.3.2.4.Biosinteza aminoacizilor din familia serinei 130
5.2.3.2.5.Biosinteza aminoacizilor din familia piruvatului..... 131
5.2.4.Biosinteza substanţelor de natură lipidică..... 131
5.2.4.1.Biosinteza acizilor graşi..... 132
5.2.4.2.Biosinteza gliceridelor..... 133
5.2.4.3.Biosinteza glicerofosfolipidelor 134

CAP.VI. GENETICA MICROORGANISMELOR DE INTERES INDUSTRIAL.... 135
1.Ereditatea la microorganisme..... 136
1.1.Rolul genetic al ADN..... 137
1.1.1.Structura ADN..... 137
1.1.2.Funcţiile ADN ca material generic..... 143
2.Bazele genetice ale selecţiei microorganismelor... 144
2.1.Selecţia naturală a microorganismelor..... 145
2.2.Selecţia artificială a microorganismelor. Mutageneză..... 145

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

2.2.1.Factori mutageni fizici..... 146
2.2.2.1.Efectele genetice ale radiaţiilor..... 148
2.2.2.Factori mutageni chimici..... 149
2.2.3.Factori mutageni biologici..... 152
2.2.4.Modificarea genetică a microorganismelor sub acţiunea factorilor mutageni 152
2.2.5.Tipuri de mutaţii la microorganisme 153
2.2.6.Rata apariţiei şi frecvenţa mutaţiilor..... 154
3.Mecanisme de transfer genetic la microorganisme 155
3.1.Transformarea genetică..... 155
3.1.1.Fazele procesului de transformare..... 156
3.2.Transducţia..... 158
3.3.Conjugarea..... 161
3.3.1.Fazele procesului de conjugare..... 161
3.4.Sexducţia..... 168
3.5.Recombinarea genetică..... 163
3.5.1.Mecanismul recombinării genetice..... 163
4.Codul genetic..... 165
4.1.Citirea codului genetic..... 167
5.Ingineria genetică a microorganismelor..... 167
5.1.Ingineria genetică şi bioingineria..... 167
5.2.Posibilităţi de folosire a ingineriei genetice în biotehnologie..... 168
5.3.Metode şi tehnici de inginerie genetică..... 171
5.3.1.Endonucleazele de restricţie..... 172
5.3.2.Plasmidele,..... 174
5.3.3.Clonarea genelor..... 176
5.3.4.ADN - ligazele..... 176
5.3.4.1.Mecanismul de acţiune a ADN-ligazelor..... 177
5.3.5.Protoplaştii şi procesele industriale 177
5.3.5.1.Fuziunea protoplaştilor..... 179
5.3.5.2.Genetica fuziunii protoplaştilor..... 180

CAP.VII. BACTERIOFAGII SI PROCESELE INDUSTRIALE
1.Clasificarea bacteriofagilor..... 182
2.Morfologia şi structura bacteriofagilor..... 183
2.1.Morfologia şi structura bacteriofagilor cu ADN..... 183

2.2.Morfologia şi structura bacteriofagilor cu ARN..... 194
3.Infecţia fagică şi replicarea..... 195
3.1.Infecţia şi replicarea fagilor cu ADN..... 186
3.2.Infecţia şi replicarea fagilor cu ARN..... 189
3.3.Fagii temperaţi şi replicarea lor 190

CAP.VIII.METODE SI SISTEME DE CULTIVARE A MICROORGANISMELOR
1.Metodologia elaborării unui sistem de cultivare... 192
2.Sisteme de cultivare discontinuă..... 194
3.Sisteme de cultivare continuă..... 196
3.1.Sisteme de cultivare continuă tip chemostat.. 196
3.2.Sisteme de cultivare continuă în mai multe trepte neramificate..... 198
3.3.Sisteme de cultivare continuă în mai multe trepte ramificate..... 200
4.Sisteme de cultivare sincronă..... 202

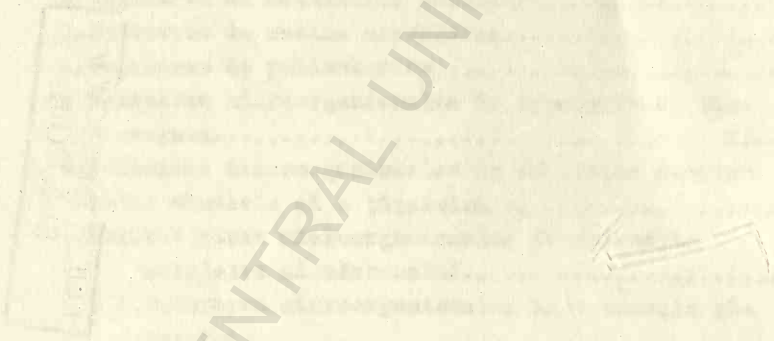
CAP.IX-IMPLICATIILE MICROORGANISMELOR IN PROCESELE INDUSTRIALE 205
1. Obţinerea de metaboliţi primari..... 207
2.Obţinerea de metaboliţi secundari..... 212
3.Obţinerea de enzime microbiene..... 216
4.Obţinerea de polizaharide..... 221
5.Folosirea microorganismelor în procesele de bioconversie..... 222
6.Folosirea microorganismelor în extracţia substanţelor minerale şi a ţiţeiului..... 223
6.1.Folosirea microorganismelor în extracţia metalelor şi cărbunelui..... 223
6.2.Folosirea microorganismelor în extracţia ţiţeiului..... 225
7.Folosirea microorganismelor în rezolvarea unor probleme medicale..... 226
8.Microorganismele sursa de energie..... 228
8.1.Obţinerea de hidrogen cu ajutorul microorganismelor..... 229
8.2.Producerea de biogaz..... 231
9.Obţinerea de îngrăşăminte microbiene şi de produse de combatere a dăunătorilor..... 232
10.Utilizarea microorganismelor în producerea de proteine (SCP)..... 234

BCU

10.1.Proteine microbiene obţinute din hidrocarburi..... 236
10.2.Proteine microbiene obţinute din alcooli.... 237
10.3.Producerea de proteine microbiene pe alte substrate..... 238
10.4.Valoarea nutritivă şi testarea eficienţei biologice a proteinei microbiene..... 240
11.Epurarea biologică a apelor reziduale..... 241
11.1.Metoda de epurarea apelor uzate..... 243
B I B L I O G R A F I E..... 246

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

P R E F A T A

Cursul de Microbiologie industrială se adresează înainte de toate studenţilor de la Facultatea de chimie industrială, Secţia de Inginerie biochimică din anul III de studii, precum şi tuturor acelor care îşi desfăşoară activitatea în industria biotehnologică microbiană.

Elaborarea unui astfel de curs pentru cei care au un fond de cunoştinţe biologice limitat, a fost o sarcină destul de dificilă pentru autor. Am încercat, şi în mare parte cred că am reuşit să prezint şi să explic noţiunile de microbiologie aplicată în industrie într-un mod cît mai clar, sintetic şi cît mai concis, încît să poată deveni accesibile şi celor mai neiniţiaţi în domeniu.

Cursul, sper să transmită suficiente cunoştinţe unui viitor specialist din industria biotehnologică, pe baza cărora să poată înţelege şi lua deciziile corespunzătoare într-o situaţie tehnologică dată. Totodată, sper ca noţiunile din curs să fie utile tuturor acelor care doresc să se specializeze în domeniul biotehnologiei microbiene

După predarea cursului pe parcursul anului universitar 1992-1993 am avut satisfacţia să constat că studenţii îl receptează bine, trezindu-le chiar mult interes. Aceasta m-a convins că în viitoarea lor pregătire va contribui din plin, oferindu-le ceea ce mulţi specialişti din domeniu, în prezent, simt lipsa: explicarea fenomenului intim al multor procese microbiene specific industriale.

Autorul este recunoscător şi aduce mulţumiri pe această cale membrilor comisiei de analiză a cursului în persoanele : doamnei Conf.univ.dr. Ailiesei Octăviţa , de la Universitatea "Al.I.Cuza" din Iaşi, doamnei Conf.dr.ing.Camelia Soldea şi domnului Prof.dr.ing.Cornelia Oniscu, de la Unuv.Tehnică "Gh.Asachi" Iaşi, pentru că au avut răbdarea să-l citească, pentru sugestiile făcute, precum şi pentru aprecierile favorabile. Li asigur că voi ţine cont de toate recomandările făcute.

Voi fi recunoscător şi celor care vor avea ocazia să-mi folosească cursul, voi lua în considerare eventualele lor recomandări şi sugestii colegiale şi de bună credinţă, pe care le voi

DANUBIUS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

analize şi folosi dacă vor confirma scopul pentru care a fost conceput cursul.

Autorul,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE SI ISTORIC

Microbiologia industrială a fost considerată o perioadă îndelungată ca o ramură a microbiologiei generale, dar odată cu dezvoltarea industriei de obţinere a unor substanţe cu ajutorul microorganismelor, cum ar fi antibiotice, enzime, acizi organici, etc. ea cîştigă teren, devenind o ştiinţă de sine stătătoare.

Microbiologia industrială se ocupă cu studiul microorganismelor folosite în diferite procese industriale în vederea obţinerii de produse alimentare, chimice sau substanţe biologice cum ar fi vitamine, enzime, hormoni, antibiotice, îngrăşăminte biologice, aminoacizi, vaccinuri, etc.

Folosirea microorganismelor în interesul omului s-a făcut cu mii de ani în urmă. Omul le folosea inconştient ca o necesitate a vieţii sale de zi cu zi, pentru producerea unor alimente sau băuturi, pentru conservarea produselor necesare vieţii lor, pentru obţinerea unor produse care contribuie la o alimentaţie umană echilibrată, etc.

Obţinerea băuturilor alcoolice prin fermentaţie a constituit una dintre primele cuceriri ale microbiologiei industriale ca ştiinţă, dar care a fost şi o mare descoperire a umanităţii.

Grecii antici atribuiau descoperirea vinului lui Dionisos, iar în tăbliţele asiriene (acum aproximativ 2000 ani î.e.n.) se consemnează că Noe îşi îmbarca în arca sa berea ca o băutură nobiliară indispensabilă, ceea ce atestă cît de vechi este acest proces tipic microbian. Apoi, fabricarea berei din orzul fermentat era cunoscută de egipteni din cele mai vechi timpuri, cam din timpul celei de a patra dinastii.

Fabricarea brînzeturilor şi a laptelui fermentat erau practicate de mii de ani în Europa şi Asia. Cam din aceeaşi perioadă datează şi prepararea pîinii.

Cu circa 1000 ani î.e.n. chinezii, pe de o parte şi indienii americani, pe de altă parte, utilizau diferite ciuperci pentru vindecarea rănilor şi plăgilor.

Existenţa microorganismelor ca agenţi ai multor transformări în natură a fost semnalată pentru prima oară de Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) care a folosit un microscop rudimentar pentru observarea şi semnalarea lor ca componenţi ai mediilor naturale. Din acest moment microbiologia în general şi cea industrială în special, se poate considera că intră în epoca ştiinţifică.

Renașterea avea să aducă revoluționarea totală a microbiologiei industriale, atît în Europa Occidentală cît și în unele țări ale Asiei.

In Ev Mediu microbiologia cunoaște o mare emploare, astfel multe metode microbiologice au fost îmbunătățite, în special, în scopul ameliorării gustului vinului, berei, pîinei, brînzeturilor prin procese fermentative inexplicabile în acea perioadă.

Progresele capitalismului industrializat a stimulat în mod impetuos dezvoltarea științifică și tehnică a microbiologiei. Acum se pun bazele fermentației ca proces.

Fermentația (derivă de la latinescu ferveré = a fierbe) ca proces a fost folosită pentru a desemna degajarea abundentă a bulelor de gaz din sucurile de fructe zaharate sub acțiunea microorganismelor din aer. Deși fermentația era cunoscută de multă vreme, cunoașterea ei științifică a început cu studiile lui Lavoiser, care întreprinde cercetări în domeniul fermentației alcoolice, stabilind cu această ocazie bilanțul chimic al transformărilor ce intervin în acest proces.

Cercetările sale sînt confirmate de Gay Lusac care stabilește ecuația chimică a fermentației alcoolice, pe care o prezintă astfel:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH$$

In anul 1803 chimistul francez Thênasd arată că agenții fermentației alcoolice sînt levurile (drojdiile), însă la acel moment descoperirea a declanșat vii discuții și controverse. Abia în anul 1835, tot în Franța, inginerul Latour confirmă cercetările anterioare, iar în Germania în același an Kützing și Schwann arată că levurile se multiplică prin înmugurire.

Pasteur (1822-1895) pe baza cercetărilor efectuate între anii 1853-1862 dovedește că fermentația alcoolică este produsă indiscutabil de către levuri. Face diferite calcule și arată bilanțul chimic al reacțiilor ce se produc. Tot el dovedește în mod practic că în cazul fermentației alcoolice pe lîngă produșii primari mai rezultă și o serie de produși secundari: glicerină, acizi grași, alți alcooli. Pasteur a fost cel ce a arătat că nu toate zaharurile fermentează, iar dintre acestea nu toate au același randament în producerea alcoolului.

Cercetările lui Pasteur au o deosebită importanță pentru microbiologia industrială, deoarece el este cel care semnalează pentru prima oară acțiunea antagonistă dintre microorganisme, adică concurența care se declanșează între microorganisme, pentru o

sursă nutritivă.

Pasteur este cel care a descoperit principiul antibiotico-terapiei. Plecînd de la acest principiu, Emrich şi Lou au izolat de la o bacterie - Pseudomonas aeruginosa - o substanţă, biocianoza, care are acţiune antibacteriană şi care a fost utilizată în terapie, dar cu rezultate inconstante. Se poate considera în prezent că aceasta a fost prima substanţă cu acţiune antibiotică descoperită de om.

Ideile lui Pasteur aveau să fie preluate, dezvoltate şi transpuse la scară semiindustrială şi industrială de către elevii săi sau de specialişti din alte ţări.

Prodigioasa activitate ştiinţifică şi practică a lui Pasteur în domeniul microbiologiei industriale a făcut ca el să fie considerat părintele acestei ştiinţe, cu el şi de la el încep marile realizări în domeniu. Progresul microbiologiei industriale aveau să devină o realitate abia la sfîrşitul secolului al XIX-lea, cînd s-a trecut la producerea la scară industrială a drojdiei de bere, obţinută prin cultivarea în profunzime a unor tulpini de levuri selecţionate. In secolul al XX-lea, în timpul primului război mondial, în Anglia s-a perfecţionat procedeul tehnic de obţinere prin fermentaţie a acetonei folosită la prepararea prafului de puşcă.

In Germania se perfecţiona cam în aceeaşi perioadă procedeul de obţinere prin fermentaţie a glicerinei.

După primul război mondial, în anul 1923 Pfitzer, în S.U.A. construieşte prima uzină de producere a acidului citric cu ajutorul microorganismului Aspergillus niger. Apoi, în numeroase ţări industrializate au început să se producă, prin fermentaţie o serie de acizi organici: acidul lactic, acidul oxalic, acidul glucuronic şi o serie de solvenţi organici cum ar fi: etanol, butanol, acetonă, etc.

In anul 1928 Al.Fleming (1881-1955) descoperă penicilina, dar transpunerea sa la scară industrială avea să se facă abia după 14 ani. Iniţiativa producerii pe cale industrială a penicilinei a aparţinut americanilor, care au alocat fonduri apreciabile pentru stimularea cercetărilor legate de industrializare şi pentru descoperirea a noi tulpini producătoare de penicilină, care să aibă un potenţial productiv mai mare ca cea a lui Fleming, a cărei potenţial era numai de 2 U/ml. Rezultatele n-au întîrziat să apară, astfel că în anul 1946 un grup de cercetători de la Laboratorul de Cercetări Naţionale din Nord, din

orașul Preoria (S.U.A.) au descoperit întîmplător pe un pepene galben intrat în putrefacție, o tulpină de Penicillium chrysogenum care produce penicilină cu un randament mult mai mare ca cea descoperită de Fleming. Randamentul acesteia, folosindu-se tehnicile moderne de ridicare a potențialului productiv, a fost ridicat la aproximativ 20.000 U/ml.

Cercetările privind descoperirea și industrializarea a noi tulpini producătoare de penicilină au fost în strînsă dependență și cu necesitățile militare din cel de al doilea război mondial.

Numărul mare de răniți din Africa, în special americani, englezi, francezi, au urgentat mult acest proces, ceea ce a făcut ca în anul 1940, Florey și Chain, să reușească să purifice penicilina, obținînd un produs cristalizat, stabil, atoxic, pentru om și animale, activ asupra unor specii microbiene patogene.

In anul 1944 Waksman descoperă streptomicina, produsă de actinomicetul Streptomyces griseus. Cercetările ulterioare au condus la descoperirea a noi antibiotice: tetraciclină, cloramfenicol, bacitracină, eritromicină, novobiocină, nistatină, etc.

In ultimii 20-30 ani, industria de biosinteză și în paralel cu aceasta microbiologia industrială, au făcut progrese mari și importante, reușindu-se pe această cale să se obțină o serie de produse chimice și biologice avantajoase ca preț și competitivitate pe piață.

In prezent, pe cale microbiană în industrie, pe lîngă un număr mare de antibiotice se produc: vitamine (B_2, B_{12}, K, B_6), hormoni (giberaline), insecticide bacteriene, vaccinuri, acizi aminici, solvenți organici, enzime, derivați sterolici, proteine microbiene, biogaz, etc.

Aceste progrese pe care le-a făcut microbiologia industrială n-ar fi fost posibile fără fundamentarea cunoștințelor despre biologia și tehnologia cultivării microorganismelor de interes industrial; fără schimbarea conceptului de bază despre fermentație, care nu este altceva decît totalitatea proceselor oxido-reducătoare prin care compușii organici ce constituie sursa de carbon și energie servesc drept donori și acceptori de hidrogen. Acceptorii de hidrogen fiind produșii finali ai procesului.

In prezent, conceptul clasic de fermentație este înțeles ca un proces legat de utilizarea industrială a microorganismelor și enzimelor cu scopul obținerii unor reacții biochimice deter-

minante, plecînd de la un compus organic ca substrat şi oxigen, ajungîndu-se în final, la o anumită substanţă specifică procesului : antibiotic, vitamină, enzimă, acid organic, etc.

In această formulare, conceptul de fermentaţie nu este acceptat de majoritatea specialiştilor, el fiind înlocuit cu cel de biosinteză a produsului X, ce reflectă mai exact realitatea.

Toate aceste schimbări în concepţia specialiştilor au condus şi la schimbări în ce priveşte conceptul actual de fermentaţie , ceea ce a făcut să se accepte şi să se distingă două tipuri de fermentaţii (sau procese fermentative) care reflectă mai fidel procesul microbian.

1.Fermentaţie (sau proces de biosinteză) aerobă, în care O_2 joacă rol de acceptor de hidrogen. Astfel de procese sînt produse de microorganismele aerobe.

2.Fermentaţiile propriu-zise în sensul clasic al cuvîntului. Ele sînt procese anaerobe în care rolul de acceptor de hidrogen îl joacă un metabolit intermediar. Agenţii acestor tipuri de fermentaţii sînt microorganismele anaerobe.

Deşi microbiologia industrială are domenii foarte vaste de aplicare totuşi, un număr relativ mic de microorganisme sînt utilizate în scopuri industriale, ele aparţin însă tuturor grupelor microbiene cunoscute în prezent.

Orice microorganism care poate fi folosit într-un proces industrial trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

1. trebuie să crească rapid pe un substrat organic cît mai ieftin;

2. trebuie să formeze uşor o cultură abundentă;

3. trebuie să fie echipat cu sisteme enzimatice specifice procesului;

4. să producă transformarea sau transformările dorite într-un mod simplu şi rapid, cu randamente superioare şi consumuri energetice limitate;

5. să poată fi conservat în timp fără a-şi schimba proprietăţile biochimice şi genetice;

6. produşii elaboraţi să fie uşor extraşi din lichidul de cultură sau celula microbiană.

BCU IMC - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C A P I T O L U L I

NORME GENERALE DE NOMENCLATURA MICROBIANA

1. Izolarea şi identificarea microorganismelor

Izolarea unui microorganism, fie el bacterie sau ciupercă, constă în operaţii de prelevare a unor probe biologice dintr-un mediu potenţial, în care se presupune existenţa microorganismului de izolat, cultivarea eşantioanelor de probe în laborator, separarea şi analizarea microorganismelor izolate.

1.1. Prelevarea (recoltarea probelor), este operaţia prin care specialistul reţine un eşantion dintr-un mediu natural în care ar fi posibilă existenţa microorganismului ce urmează a fi izolat.

Numărul de probe luate, trebuie să varieze în funcţie de obiectivul urmărit, de densitatea posibilă a microorganismului de izolat sau de răspîndirea sa într-un anumit interval de timp. De exemplu, în perioada de iarnă numărul şi densitatea microorganismelor este mult mai limitată decît în perioada de primăvară-toamnă. Verile secetoase limitează şi ele numărul de microorganisme.

Probele pentru izolare se pot preleva din apa mării, apele curgătoare sau stătătoare, locuri mlăştinoase, sol, de pe materialele intrate în putrefacţie, etc. In general, este mai puţin posibil să izolăm un microorganism celulozolitic din apele curgătoare, decît din zone cu materiale celulozice intrate în putrefacţie, sau să izolăm un microorganism producător de antibiotice din apa mării, decît din soluri fertile şi exemplele ar putea continua.

Probele prelevate sînt duse în laborator şi sînt supuse unor tehnici speciale de cultivare, prin care se urmăreşte păstrarea acelor microorganisme ce sînt urmărite prin programul de izolare şi se îndepărtează cele ce nu corespund scopului urmărit.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2.Lucrări pregătitoare în laborator.

Lucrările pregătitoare efectuate în laborator cuprind printre altele următoarele operaţii: sterilizarea sticlăriei necesară prelevării probelor, pregătirea şi sterilizarea apei pentru efectuarea diluţiilor, pregătirea şi sterilizarea mediilor de izolat şi de cultivare a izolatelor, etc.

Una dintre operaţiile principale ce se efectuiază în laborator este operaţia de obţinere a diluţiilor de probe. Gradul de diluare a probelor este determinat de numărul de germeni ce se presupune că ar exista în proba de lucru. Tehnica plăcilor turnate a lui Koch ne indică că diluaţia la care trebuie să se lucreze în cazul bacteriilor este de 1/100.000, iar în cazul ciupercilor diluţia optimă este de 1/1000.

In general , se recomandă să se stabilească într-o experienţă prealabilă diluţia optimă de izolare.

Se apreciază că diluţia optimă pentru bacterii ar fi aceea la care numărul de colonii apărute pe o placă Petri nu este mai mare de 50-70, iar cel al ciupercilor să nu fie mai mare de 20-25.

Mediile folosite , trebuie să prezinte o anumită umiditate încît să nu modifice izotonismul celulei microbiene. Natura şi cantitatea substanţelor nutritive din mediul de cultură, trebuie să corespundă, pe cît posibil, cerinţelor microorganismului izolat, iar necesitatea în factori de creştere nu trebuie subestimată.

Concentraţia ionilor de hidrogen (pH-ul) şi potenţialul redox (valoarea rH)trebuie să corespundă de asemenea cerinţelor microorganismului izolat.Apoi,forma sub care se folosesc elementele nutritive este de asemenea determinată de proprietăţile fiziologice nutritive ale micr organismului. Microorganismele autotrofe asimilează elementele numai legate în diferiţi compuşi organici, pe cînd cele heterotrofe asimilează substanţele organice libere.

La prepararea mediilor de cultură trebuie deci luată în considerare şi natura compuşilor chimici.

După compoziţia lor chimică şi după scopul pentru care sînt pregătite mediile de cultură se împart în:

1.Medii nutritive naturale
2.Medii nutritive sintetice

Mediile nutritive naturale sînt acele medii a căror compo-

ziţie chimică nu este cunoscută exact, iar pentru prepararea lor, se întrebuinţează produse de origine animală sau vegetală.

Mediile nutritive sintetice sînt considerate acelea care conţin numai substanţe chimice bine definite. Pentru prepararea lor se întrebuinţează sărurile minerale.

După gradul de utilitate mediile de cultură se pot împărţi:

1.Medii nutritive generale, care nu sînt altceva decît acele substanţe nutritive care satisfac cerinţele nutritive a unui număr mare de microorganisme, de exemplu bulionul nutritiv.

2.Medii nutritive speciale sau elective, care oferă condiţii de dezvoltare numai anumitor specii de microorganisme, de exemplu mediile nutritive pentru izolarea unor antibiotice.

Mediilor de cultură li se pot adăuga substanţe suport speciale (agar sau gelatină). Aceste suporturi speciale au rolul de a fixa şi separa microorganismele supuse izolării, oferind, totodată, posibilitatea unei repicări sigure şi rapide.

Izolarea microorganismelor de interes industrial se poate face cel puţin pentru următoarele şase motive:

1. izolarea de microorganisme folosite în procesele de obţinere a biomasei concentrate vitamino-proteic;

2. izolarea de microorganisme producătoare de:vitamine, enzime, pigmenţi, toxine, etc;

3. izolarea de microorganisme producătoare de metaboliţi primari şi secundari: antibiotice, acizi aminici, acizi organici, alcooli, etc;

4. izolarea de microorganisme folosite în conversii biochimică a unor substanţe, cum ar fi hidroxilarea steroizilor şi obţinerea de sorboză;

5. izolarea de microorganisme folosite la efectuarea unor separări stereochimice, ce prin metode chimice se realizează deficitar şi costisitor;

6. izolarea de microorganisme folosite în degradarea unor compuşi chimici mai mult sau mai puţin complecşi din apele industriale sau uzate.

1.3.Obţinerea microorganismelor de interes industrial..

Obţinerea microorganismelor de interes industrial se poate face pe două căi:

1. prin izolarea lor din procesele fermentative naturale, din sol, aer, apă, nămoluri activate, diferite substanţe organice intrate în procese de descompunere naturală, etc;

2. prin solicitarea de izolare la băncile (colecţiile) de microorganisme.

Pentru izolarea microorganismelor de interes industrial, pe lîngă metodele şi procedeele clasice se cunosc şi metode expeditive.

Metodele clasice urmăresc izolarea unui microorganism prin folosirea de tehnici de lucru relativ greoaie şi care implică multă manoperă şi activităţi laborioase. Ele se aplică totuşi în izolarea unor microorganisme cu proprietăţi speciale sau patogene.

Metodele moderne urmăresc izolarea microorganismelor de interes industrial pe căi rapide şi eficiente, prin care se realizează atît izolarea cît şi selecţia acestora. O metodă larg utilizată în acest sens este metoda screening. Ea are o mare aplicabilitate în special în izolarea microorganismelor producătoare de antibiotice.

Principiul acestei metode constă în testarea proprietăţilor unei populaţii mixte de microorganisme obţinută dintr-o probă prelevată dintr-un mediu natural, urmărindu-se totodată şi capacitatea sa productivă.

Tehnica screening prezintă o variantă larg utilizată în izolarea microorganismelor de interes industrial. Aceasta este cunoscută sub numele de metoda plăcilor aglomerate (crowded plate method), metodă ce constă în a inocula 1 ml dintr-o suspensie a diluţiei 1/10 sau 1/100 pe o placă Petri cu geloză nutritivă, însămînţată prealabil în mod uniform cu un germene test faţă de care se caută un antagonist. Placa se incubează la 28-37°C, în care condiţii va avea loc, pe de o parte, dezvoltarea microorganismului test, iar pe de altă parte, se va dezvolta microorganismele supuse procesului de izolare. Dacă în proba care am folosit-o pentru izolat există microorganisme producătoare a unei substanţe cu efect inhibant asupra bacteriei test, colonia izolată va fi înconjurată de un halou clar, aparent ca urmare a inhibării creşterii acestuia. Această colonie, deci va fi producătoare a unei substanţe biologicactive cu efecte destructive asupra diferitor microorganisme, ea se va repica şi se va trece pe un mediu de păstrare.

O altă variantă a screeningului este metoda inoculării directe, care constă în plasarea pe placa Petri inoculată anterior cu germenele test, a probei de izolat în mai multe puncte distincte. După incubare se poate observa existenţa sau inexistenţa zonelor clare şi prezenţa izolatului.

O metodă larg utilizată în prezent este metoda striurilor. Această metodă constă în însămînţarea cu ansa în striuri a probei, după care perpendicular pe acestea se însămînţează tulpina test. Se incubează, se urmăresc efectele şi se repică izolatul cel mai valoros.

Pentru izolarea microorganismelor producătoare de proteine microbiene (SCP) se foloseşte în general metoda culturilor îmbogăţite. Folosirea acestei metode oferă posibilitatea obţinerii unor microorganisme producătoare de SCP de înaltă productivitate.

In cazul izolării microorganismelor producătoare de enzime se pot folosi metodele clasice, însă la mediile de izolat trebuie adăugaţi nutrienţi inductori ai enzimei. Inductorul va avea efecte stimulatorii asupra creşterii microorganismelor ce posedă echipamente enzimatice de hidroliză a sa.

Orice tulpină microbiană după izolare trebuie supusă testelor de identificare şi caracterizare,

Metodologia de identificare şi caracterizare a unui microorganism, cuprinde o serie de teste morfologice, fiziologice, biochimice, serologice şi genetice, pe baza cărora microorganismul poate fi încadrat într-o ordine sistematică, cu alte cuvinte i se recunoaşte identitatea şi poziţia în lumea microorganismelor.

O perioadă îndelungată de timp, pînă aproximativ în jurul anilor '55 a acestui secol, testele morfologice şi fiziologice erau considerate relevante în identificarea şi caracterizarea unui microorganism, dar numai ele s-a constatat că nu sînt suficiente. De aceea, s-a trecut la utilizarea pe o scară din ce în ce mai largă a testelor biochimice, genetice, serologice sau chiar a unor teste cu totul particulare cum ar fi: conţinutul în acizi graşi (la bacteriile metilotrofe) sau depistarea unor enzime specifice unor anumite microorganisme (cele care realizează conversia steroizilor).

Privită în ansamblu o orice procedură de identificare şi caracterizare a unui microorganism, începe cu determinarea morfologiei sale şi se încheie cu teste genetice sau serologice sau cu unele teste speciale, dacă este nevoie.

Caracterele morfologice urmărite în procesul de identificare sînt: forma şi mărimea celulei, tipul de creştere şi mişcare a celulei, reacţia celulei la colorare, prezenţa, forma şi mărimea sporilor, prezenţa, forma şi distribuţia cililor, prezenţa sau absenţa stratului mucos, etc.

Testarea comportării fiziologice a microorganismelor este o cale pe care se obţine un surplus de date deosebit de importante, deoarece este ştiut că anumite grupe de microorganisme sau chiar anumite specii au preferinţe bine determinate în ceea ce priveşte comporterea faţă de factorii fiziologici. In acest sens trebuie verificat modul în care se comportă microorganismul izolat faţă de sursele nutritive şi cerinţele exacte pe care le are faţă de acestea. Se va testam totodată, necesarul în factori de creştere, deoarece este bine cunoscut că unele microorganisme nu cresc decît dacă în mediul de cultură se află un anumit factor de creştere.

Multe microorganisme necesită pentru creşterea şi dezvoltarea lor normală anumite microelemente, ce face ca această comportare să fie şi ea o informaţie în identificare.

Comportarea faţă de oxigen este un test edificator în ceea ce priveşte departajarea microorganismelor în aerobe şi anaerobe.

Caracterizarea unei specii microbiene din punct de vedere fiziologic trebuie să cuprindă şi analiza produselor de metabolism ce se acumulează în mediul nutritiv. Se pot testa printre altele: producerea de alcooli, amoniacul, hidrogenul sulfurat, iodul şi produsele de reducere a acidului azotic, etc.

Capacitatea reducătoare a microorganismelor se poate testa prin acţiunea de decolorare a albastrului de metilen. Cultivare pe lapte degresat şi modificările ce au loc, de exemplu, coagularea sau peptonizarea cazeine, precum şi producerea de gaz, furnizează informaţii preţioase pentru identificarea şi caracterizarea microorganismului izolat.

Comportarea microorganismului izolat faţă de concentraţia ionilor de hidrogen (pH), precum şi faţă de limitele extreme a unor factori optimi de creştere: temperatură, umiditate, lumină, etc. aduc noi informaţii necesare identificării şi caracterizării microorganismelor.

La toate acestea se poate adăuga şi alte teste specifice unui anumit grup de microorganisme, în funcţie de scopul urmărit de experimentator

Modul de utilizare a unor substanţe, precum şi căile metabolice ce le poate urma un anumit microorganism se pot determina prin efectuarea de teste biochimice. Hidroliza lipidelor, celulozei, amidonului, ureei, etc. se urmăreşte prin cultivarea microorganismului pe medii speciale, iar comportarea lor faţă de substanţele supuse hidrolizei sînt informaţii importante în depistarea unor căi metabolice.

Testele privind reacţia oxidazică, citocromoxidazică, catalazică, fenilalanindezaminazei, triptofandezaminazei, betagalactozidazei sînt alte teste biochimice care aduc informaţii suplimentare şi de mare ajutor în identificarea şi caracterizarea microorganismelor.

Comportarea serologică a microorganismelor aduce şi ea un surplus de date, în special în identificarea speciei microbiene. Aglutinarea, precipitarea, fixarea complementului sînt reacţii specifice în identificarea microorganismelor.

Testele genetice, în special cele ce privesc conţinutul în ADN şi ARN, prezenţa plasmidelor, prezenţa sau absenţa canalului de conjugare, caracterizarea cromozomului la unele bacterii sau a celui plasmidial sînt date de o deosebită importanţă în aprecierea poziţiei taxonomice a unui microorganism.

2. Clasificarea microorganismelor.

2.1. Tipuri de organizare celulară la microorganisme

Microorganismele deşi formează un grup mare de organisme, foarte heterogen şi mult diferite de altele existente în lumea vie, prezintă o serie de particularităţi cum ar fi: prezenţa sau absenţa unui nucleu veritabil, numărul de cromozomi prezenţi în celulă, prezenţa sau absenţa membranei nucleare, rata de sedimentare a ribozomilor, prezenţa sau absenţa mitocondriilor, etc. care au determinat pe cei mai mulţi specialişti să le împartă în două mari grupe:

A. Tipul procariot;

B. Tipul eucariot.

A. Tipul procariot sau procariotele reprezintă grupa de microorganisme a căror dimensiuni celulare şi structură celulară prezintă o organizare relativ simplă, iar din punct de vedere metabolic sînt particulare.

Forma lor de organizare funcţională şi structurală este

celula, ea fiind capabilă de o existenţă autonomă în condiţii de mediu adecvate, de înoire a propriei substanţe, de creştere şi dezvoltare şi de desfăşurare a unor procese metabolice tipic celulare. Aceste microorganisme sînt capabile de multiplicare şi reproducere, cu formarea de noi unităţi structurale şi funcţionale.

Celula procariotă are un nucleu primitiv atipic. Acesta este reprezentat în exclusivitate printr-un cromozom care nu este asociat cu un nucleol şi nu este separat de citoplasmă printr-o membrană nucleară. Informaţia genetică este depozitată la nivelul cromozomului şi este codificată într-o singură moleculă de ADN. In cursul procesului de multiplicare, în citoplasma nedivizată, pot exista mai mulţi cromozomi, care însă sînt identici, rezultînd din dedublarea cromozomului unic.

Celulele procariote se reproduc pe cale asexuată, adică prin diviziune directă sau sciziparotate şi numai excepţional pe cale sexuată, prin conjugare. Din această cauză celulele de procariote sînt în mod normal haploide(cu un singur set de cromozomi). La formele la care se întîlneşte fenomenul de conjugare, celula "femelă" devine parţial şi temporar diploidă (cu un număr dublu de cromozomi), însă această stare încetează prin reconstituirea stării haploide, ce survine înainte de prima diviziune , imediat după conjugare.

Citoplasma celulelor procariote este lipsită de curenţi citoplasmatici. Ea nu conţine organite delimitate de membrane superior organizate. In interiorul ei nu există un reticul endoplasmatic organizat, ci numai sisteme membranare izolate.

Cu foarte mici excepţii (microplasmele) toate procariotele au un perete celular rigid, aceasta datorită prezenţei în structura sa a unui polimer complex, un mucopolizaharid, care îi conferă rezistenţă.

In acest mare grup de microorganisme sînt incluse: bacteriile şi algele. In raport cu necesităţile nutritive ele se pot grupa:

a)Microorganisme fotoautotrofe, în această grupă sînt incluse algele verzi şi bacteriile fotosintetizante care utilizează ca sursă de energie lumina, iar bioxidul de carbon ca cursă să carbon.

b)Microorganisme fotoheterotrofe, sînt acele organisme dependent de lumina pe care o folosesc ca sursă de energie, iar ca

sursă de carbon folosesc compuşii organici. In acest grup sînt incluse bacteriile purpurii, fără sulf.

c) Microorganisme chimoautotrofe, sînt microorganismele dependente de diferite substanţe chimice pe care le folosesc ca sursă de energie, iar ca sursă de carbon foloseso bioxidul de carbon. Acestea au capacitatea de a oxida sulful sau hidrogenul sulfurat, iar energia rezultată din oxidare este folosită pentru reducerea bioxidului de carbon. In această categorie intră o serie de bacterii chimoautotrofe.

d) Microorganisme chimoheterotrofe, sînt microorganismele care îşi obţin energia necesară proceselor celulare din descompunerea diferitor compuşi organici carbonaţi. In grupa lor intră cele mai multe bacterii şi chiar unele eucariote.

B. Tipul eucariot, sau eucariotele sînt organisme cu o organizare celulară superioară. Celula eucariotă are un nucleu tipic, veritabil, de unde le vine şi denumirea de eucariote. In starea de repaus, nucleul conţine în afară de cromatină reticulată sau granulată, unul sau mai mulţi nucleoni. Cromatina este reprezentată de molecule de ADN, iar nucleolii sînt formaţi din molecule de ARN. Nucleul este separat de citoplasmă printr-o membrană dublă. Informaţia genetică depozitată în ADN se repartizează la începutul diviziunii nucleare în unităţi structurale, cromozomi. Inmulţirea se face atît asexuat cît şi sexuat.

Citoplasma eucariotelor este permanent străbătută de curenţi citoplasmatici. Ea conţine structuri delimitate de membrane bine structurate (mitocondrii şi cloroplaşti). In interiorul citoplasmei se găseşte un sistem membranos diferenţiat - reticulul endoplasmatic.

Peretele celular rigid lipseşte la celulele cu organizare superioară, celula fiind delimitată numai de membrana citoplasmatică.

In această categorie de microorganisme intră: levurile, unele alge şi fungii.

2.2. Principii taxonomice în clasificarea microorganismelor.

Marea diversitate a lumii microorganismelor a impus încă de la începuturile cunoaşterii ei găsirea unui mod de organizare şi sistematizare a sa.

Incercările de ordonare şi sistematizare a lumii microorganismelor s-a lovit încă de la început de mari dificultăţi ,

care sînt cauzate, în primul rînd de faptul că microbiologul trebuie să le studieze nu ca indivizi,ci ca populaţii,şi în plus, nu în mediul lor natural, ci izolate de acesta, în condiţii artificiale de laborator. Intrucît, în laborator nu se poate reproduce niciodată întocmai condiţiile naturale, trebuie procedat în aşa fel încît modificările să nu fie prea frapante.

Orice microorganism odată izolat şi identificat trebuie inclus într-un sistem de ordonare taxonomică. Acest sistem este constituit dintr-o serie de noţiuni care înglobează o serie de caractere ale microorganismului respectiv prin care el îşi dobîndeşte o anumită poziţie în lumea vie. Acest sistem este cunoscut sub numele de sistem de nomenclatură microbiană, ele incluzînd o serie de categorii taxonomice specifice lumii vii.

Principalele categorii de nomenclatură microbiană sînt:

-tulpina microbiană, specia, genul, familia, ordinul, clasa diviziunea sau filum.

-Tulpina microbiană, reprezintă o cultură pură a unei specii ce provine din descendenţii unei singure izolări. In mod obişnuit ea este denumită adăugîndu-se la numele specii, numele persoanei care a făcut izolarea, numele localităţii de unde a fost izolată, un număr orientativ sau un alt semn convenţional.

-Specia este forma de existenţă a unui individ microbian. Transcrierea sa se face cu literă mică şi reprezintă "prenumele" microorganismului respectiv.

-Genul, reprezintă un grup taxonomix format din mai multe specii, înrudite cu specia tip. El poate fi format dintr-o singură specie sau, în mod obişnuit, din mai multe specii.

-Familia, este grupul taxonomix format din mai multe genuri înrudite. Numele familiei se formează de la numele genului tip la care se adaugă surfixul "aceae". De exemplu, numele Pseudomonas devine Pseudomonadaceae, nume de familie.

-Ordinul, este constituit dintr-un grup de familii înrudite şi este denumit prin substituirea cu surfixul "ales", a surfixul "aceae" din numele de familie. De exemplu, Pseudomonadaceae este numele de familie, prin substituire se obţine Pseudomonadales, nume de ordin.

-Clasa, este un grup taxonomic format din mai multe ordine înrudite. De exemplu, Clasa Schizomycetes sau Bacteria.

-Diviziune sau filum, este ordinea sistematică care include mai multe clase înrudite. De exemplu, Filum Protophyta care

cuprinde Clasa bacteriilor şi ciupercilor.

Numele acestor categorii taxonomice se transcriu cu cuvinte greceşti sau latineşti. Numele de gen, familie, ordin, clasă şi filum se transcriu cu litere mari, iar cel de specie cu litere mici. De exemplu Pseudomonas aerogenes, Pseudomonas este genul şi s-a transcris cu litere mari la începutul cuvîntului, iar aerogenes este specia şi s-a transcris cu litere mici.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C A P I T O L U L I I

BIOLOGIA MICROORGANISMELOR DE INTERES INDUSTRIAL

Microorganismele folosite în diferite procese industriale aparţin tuturor grupelor sistematice cunoscute în prezent. Ele pot fi bacterii, levuri sau fungi. Toate aceste microorganisme au proprietatea metabolică de a produce substanţe de interes industrial şi uman.

B A C T E R I I L E

Deşi primele bacterii au fost evidenţiate de către A.van Leeuwenhoek (1675), recunoaşterea lor ca grup distinct, a fost făcută abia în perioada anilor 1850-1875 de către Cohn, pe baza stabilirii grupului omogen de eubacterii (bacterii adevărate sau generice).

Cu toate că Cohn constată că cele mai multe bacterii descoperite de el şi alţi autori, au proprietăţi relativ omogene, ulterior s-a descoperit că există multe printre acestea, care prezintă o serie de particularităţi ce le apropie de alte categorii microbiene. In această categorie de bacterii particulare au fost trecute actinomicetele, mixobacteriile, cianobacteriile, etc. Bacteriile aparţinînd acestui grup au fost considerate bacterii particulare şi ele sînt studiate separat de cele tipice sau generice.

1. Tipul generic de bacterii

Toate aceste bacterii au la bază un caracter comun: celula de tip procariot, în forma sa tipică.

In general, toate bacteriile tipului generic sînt unicelulare, de dimensiuni microscopice, cu morfologie variată şi cu un echipament enzimatic mai mult sau mai puţin complex, în funcţie de specie. Multe dintre ele prezintă interes industrial.Cel deja utilizate în diferite procese industriale sînt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1.

BACTERII DE INTERES INDUSTRIAL

Familia	Genul	Gram + sau -	Aerobe + Anaerobe -	Domeniu de utilizare.
Micrococcaceae	Sarcina	+	+	Ind.de medicamente
	Zymosarcina	+	+	Ind.de medicamente şi vaccinuri.
	Micrococcus	+	+	Idem
Lactobacteriaceae	Streptococcus	+	+	Idem
	Leuconostoc	+	+	Produc.de dextran
	Lactobacillus	+	+	Produc.de ac.lactic
Propionibacteriaceae	Propionibacterium.	+	+	Pentru producerea de vitamina B.12
Corynebacteriaceae.	Corybacterium	+	±	Producerea de L-lizină. Pentru transformarea stereoizilor.
Bacillaceae	Clostridium	+	-	Fermentaţia acetobutirică.
	Bacillus	+	+	Transformări chimice şi enzimatice. Obţinerea bacitracinei.
Enterobacteriaceae	Escherichia	-	+	Pt.producerea de enzime.
	Salmonella	-	+	Obţinerea de vaccinuri.
	Shigella	-	+	Idem
	Aerobacter	-	+	Producerea de enzime.
Azotobacteriaceae	Azotobacter	-	+	Producerea de enzime şi exopolizaharide.
Brevibacteriaceae	Brevibacterium	+	+	Producerea de ac. L-glutamic.
Rhizobiaceae	Rhizobium	-	+	Producerea de enzime.
Thiobacteriaceae	Thiobacillus	-	+	Producerea de enzime Separarrea metalelor
Pseudomonadaceae	Pseudomonas	-	+	Producerea de enzime şi proteine.Fermentaţie acetică.
Methylomonadaceae.	Methylomonas	-	+	Producerea de proteine.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

1.1.Morfologia bacteriilor

Forma şi dimensiunile bacteriilor, este caracteristică fiecărei specii în parte.

După formă bacteriile se pot grupa astfel:

1.bacterii rotunde (cocoide);

2.bacterii alungit - cilindrice (bacilare, bacili);

3.bacterii spiralate (elicoidele).

1.Bacteriile rotunde sau cocoide, sînt în general de formă sferică, ovală, elipsoidală, reniformă, uneori neregulată.La cele mai multe diametrul longitudinal şi cel transversal sînt aproximativ egale. Forma rotundă poate fi adesea modificată de diferiţi factori culturali, de aceea este discutabil dacă în stare vie celula acestor bacterii este realmente rotundă.

In funcţie de modul de dispunere a celulelor rezultate din diviziune, bacteriile cocoide pot prezenta mai multe subtipuri:

a)cocci simpli sau izolaţi, la care celulele rezultate din diviziune rămîn independente;

b)diplococi,la care diviziunea se face după planuri succesive, paralele, celulele rezultate rămînînd grupate cîte două;

c)streptococi, la acest subtip celular diviziunea se face după planuri succesive, paralele, dar celulele rezultate rămîn unite între ele formînd lanţuri;

d)tetracoci sau tetrada, la care planurile succesive de diviziune sînt perpendiculare unele faţă de altele, iar celulele rezultate sînt dispuse în grămezi de patru elemente;

e)sarcina, la aceasta, planurile de diviziune sînt orientate în trei direcţii diferite ale spaţiului şi sînt perpendiculare unul pe altul (al doilea pe primul şi al treilea pe primele două). In urma acestui mod de divizare celulară, rezultă o grupare sub formă de cub sau pachete;

f)stafilococul, este formaţiunea ce rezultă prin dispunerea planurilor de diviziune în mai multe direcţii, celulele rezultate se aranjează în grupări neregulate sub formă de ciorchini.

2.Bacterii alungit - cilindrice sau bacilare - au formă de bastonaşe cu dimensiunea longitudinală de cîteva ori mai mare decît cea transversală.Unele dintre aceste bacterii pot să prezinte abateri de la forma tipică, abateri ce se referă la marginele şi extremităţile celulei. Marginele celulei pot fi paralele sau îndepărtate la una sau ambele extremităţi, dîndu-i aspect de măciucă sau haltere (Corynebacterium diphteriae:)

sau din contra sînt apropiate la capete, celula avînd aspect de fus (Fusobacterium fusiforme).

La majoritatea speciilor extremităţile celulare sînt rotunde, la unele specii pot fi şi retezate ca la Bacillus anthracis.

Bacilii pot prezenta şi ei mai multe subtipuri:

a)diplobacilii, sînt grupări de cîte două celule;

b)streptobacilii, sînt formaţiuni bacilare dispuse în lanţuri;

c)palisade, celulele se dispun sub forma unei palisade (ca scîndurile de la un gard);

d)bacili stelaţi, celulele se dispun în formă de stea sau rozetă.

3.Bacterii spiralate, cuprind acele bacterii a căror celule au formă de spirală. Ele cuprind trei subtipuri morfologice distincte:

a)vibrionul, cuprinde bacteriile sub formă de virgulă;

b)spirilul, celulele au formă de spirală cu mai multe ture de spire rigide;

c)spirocheta,celulele au formă de spirală cu mai multe ture de spire, dar acestea sînt flexibile,putîndu-se strînge sau relaxa.

Dimensiunile bacteriilor

Bacteriile sînt organisme de dimensiuni foarte mici, fapt pentru care ele nu se pot observa decît la microscop. Dimensiunile lor medii variază între 0,5-1/3 - 6 μm. Cele mai mici dintre ele se apropie chiar de limita de rezoluţie a microscopului optic (0,1-0,3/1-3 μm).

1.2.Proprietăţi fizice

Densitatea sau greutatea specifică a celulei bacteriene vii, în stare umedă, variază între 1,07-1,30. Valoarea sa este în funcţie de proporţia relativă în substanţe a celulei. Acestea avînd densităţi diferite de cea a apei vor determina creşterea sau scăderea densităţii în funcţie de concentraţia lor în celulă. De exemplu, lipidele au densitatea sub 1,0; glucidele 1,4-1,6; proteinele 1,5; acizii nucleici 2,0; sărurile minerale 2,0-2,5. Dominarea uneia sau alteia dintre acestea vor conduce la creşterea sau scăderea densităţii în raport de densitatea substanţei dominante.

BCU CLUJ CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Deoarece compoziţia chimică a celulei bacteriene este variabilă chiar la aceiaşi specie, ea fiind dependentă de condiţiile de mediu, sau de vîrsta celulei, densitatea va varia şi ea în raport cu acestea. Astfel, celulele tinere, care sînt turgescente au o densitate mai mică decît celulele bătrîne, iar celulele bacteriene cultivate pe medii lichide au o densitate mai mică decît cele cultivate pe medii solide.

Suprafaţa celulei bacteriene se poate calcula încadrînd bacteria într-o formă geometrică regulată. Ea este mult diferită de la specie la specie. De exemplu, la E.coli suprafaţa celulei este de 35,340 x 10^{-9} cm^2, pe cînd la Saprospira grandis ea este de 12.576 x 10^{-9} cm^2.

Volumul celulei bacteriene poate fi apreciat cu ajutorul formulelor de calcul aplicate corpurilor geometrice regulate (în special sfera sau cilindrul), în care se încadrează cele mai multe bacterii. Volumul celulei bacteriene se exprimă în μm^3. Valorile sale variază de la specie la specie şi de la un grup de microorganisme la altul. De exemplu, bacteriile au volume cuprinse între 0,1-20 μm^3, pe cînd levurile au volume de 20-50 μm^3.

Greutatea unei bacterii poate fi calculată împărţind greutatea unei anumite mase de celule la numărul unităţilor componente. De exemplu, celula de E.coli are greutatea de 10^{12} daltoni şi este cu 6 x 10^6 daltoni mai mare decît greutatea unei molecule de apă (18 dal).

Raportul dintre suprafaţa celulei şi greutatea sa are o valoare foarte ridicată la bacterii. Datorită raportului foarte mare dintre suprafaţă şi greutate, o cantitate mică de bacterii de exemplu, 1 g conţine 1,8 x 10^{12} celule, însumează o suprafaţă de contact cu mediu de circa 56.000 cm^2, iar 1 g de celule de drojdii ce conţine 8,3 x 10^9 celule, dau o suprafaţă de 9.100 cm^2. Deci, cu cît celula este mai mare, suprafaţa ei scade.

1.3. Ultrastructura celulei bacteriene

Datorită dimensiunilor mici şi particularităţilor fizico-chimice ale structurilor componente, structura internă a bacteriilor a fost mult timp ignorată sau chiar contestată, unii specialişti considerîndu-le pur şi simplu un fel de "saci de enzime". Descrierea constituienţilor celulari a devenit posibilă odată cu perfecţionarea tehnicilor de cercetare, în special a celor de citochimie şi microscopie electronică.

In raport cu peretele celular, constituienţii celulari bacterieni pot fi grupaţi în două mari categorii:

a) intraparietali, care formează protoplastul şi care sînt reprezentaţi prin: membrana plasmatică sau citoplasmatică, citoplasmă, ribozomi, material nuclear, incluziuni, vacuole;

b) extraparietali în categoria cărora intră: capsula, stratul mucos, glicocalixul, flagelii şi pilii.

Principalii constituenţi celulari sînt prezentaţi în fig.1.

1.3.1. Peretele celular

Celula bacteriană este delimitată la exterior de un perete celular bine definit structural. El are o consistenţă rigidă, acoperind membrana citoplasmatică pe toată întinderea ei, iar spre exterior poate fi el însuşi acoperit, la unele specii, de o capsulă sau strat mucos.

Datorită indicelui de refracţie mic, peretele celular este

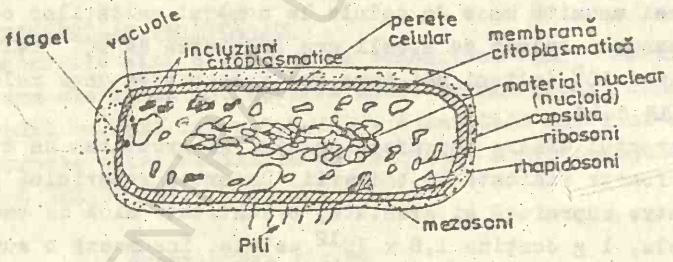


Fig.1. Reprezentarea schematică a principalilor componenţi structurali ai unei celule bacteriene.

invizibil ori foarte greu vizibil la celulele vii examinate la microscopul fotonic. Evidenţierea lui este posibilă, însă prin aplicarea tehnicilor de colorare selectivă sau prin examinarea la microscopul electronic.

La celulele tinere, la care citoplasma este omogenă, compactă şi abundentă, peretele celular aderă intim la conţinutul celulelor subiacente. La celulele bătrîne, sau în curs de liză,

peretele celular devine evident, fiind depărtat de citoplasmă.

Grosimea peretelui celular la bacterii variază între 15-35 nm (150-350 Å), el reprezentînd 20-35% din greutatea uscată a celulei.

Peretele celular este rigid, rigiditatea ce este dată de un peptidoglican - mureina. Acest polimer formează un fel de rețea ce dă o structură caracteristică peretelui celular.

Din punct de vedere ultrastructural peretele celular este multistratificat, însă în ceea ce privește numărul de straturi, precum și compoziția lor chimică, el este diferit la cele două categorii de bacterii: Gram-pozitive și Gram-negatice, diferențiere dată de modul în care acestea fixează coloranții specifici.

Toate bacteriile vor prezenta în structura lor peptidoglicanul, dar diferența dintre ele va fi dată de prezență, natura, cantitatea și aranjamentul structural al proteinelor, polizaharidelor și lipidelor (Tabelul 2).

-Peretele celular la bacteriile Gram - pozitive (Fig.2) este relativ omogen, deși frecvent pot fi deosebite mai multe straturi, foarte rar bine definite. Componentul major al acestui tip de perete celular este peptidoglicanul, el reprezentînd circa 80-90% din greutatea uscată a sa.

Tabelul 2

Componenții chimici ai peretelui celular al bacterii

Bacteriile Gram-pozitive	Bacteriile Gram-negative
Peptidoglican-multistrat (grosime = 0,02-0,06 μm)	Peptidoglican - monostrat (grosime = 0,01 μm)
Proteine	Lipoproteine
Acizi teicoici	Lipopolizaharide
Acizi teichauronici	Fosfolipide
Polizaharide	Polizaharide

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

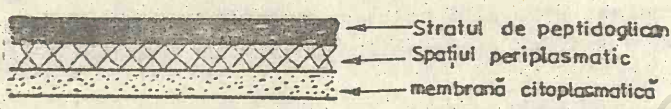


Fig.2. Ultrastructura peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive.

Peretele celular la toate bacteriile Gram-pozitive poate fi distrus cu multă uşurinţă, în special în faza de creştere logaritmică şi mai greu în faza staţionară.

Peptidoglicanul este un heteropolimer compus dintr-o componentă glicanică şi una peptidică.

Componenta glicanică, foarte uniformă, are structura unor lanţuri liniare, formate din resturi alternative a două N-acetilhexozamine diferite: N - acetilglucozamină şi acidul N - acetilmuramic, legate între ele prin legături beta - 1,4. Gruparea carboxil (-COOH) al resturilor de acid N-acetilmuramic formează punctele de legătură al lanţurilor peptidice.

Componenta peptidică, conţine ca unitate de constituţie un tetrapeptid cu următoarea structură: L-alanil - gama - D - glutamil - L - R_3 - D - alanină. Restul L-R_3 poate fi un aminoacid neutru (L-alanină sau L-homoserină), un aminoacid dicarboxilic (acidul L-glutamic) sau un aminoacid diaminat (L-lizina, L-ornitina, etc).

Pe lîngă peptidoglican peretele celular al bacteriilor Gram-pozitive mai conţine: acid teicoic, acid teichauronic, polizaharide şi proteine.

-Peretele celular la bacteriile Gram-negative (Fig.3 şi 4)

Deşi mai subţire ca la bacteriile Gram-pozitive, peretele celular la bacteriile Gram-negative este distinct stratificat şi prezintă o serie de particularităţi demne de remarcat. Ele are o structură mai complexă datorită prezenţei spre exterior a unei membrane tristratificate. Acest manşon tristratificat este format din lipopolizaharide şi lipoproteine. Apoi, stratul de peptidoglican este subţire (0,01 μm) şi nu reprezintă decît 10% din greutatea uscată a peretelui celular. La multe bacterii Gram-negative, peptidoglicanul aderă intim de manşonul extern tristratificat(fig.3.)

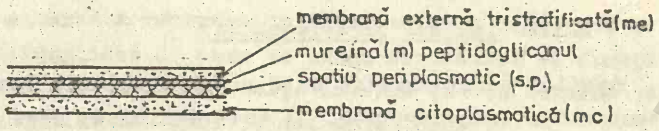


Fig.3. Reprezentarea schematică a peretelui celular la bacteriile Gram-negative.

La alte bacterii, pătura de peptidoglican vine în contact cu manşonul extern numai din loc în loc, iar aceasta din urmă formează pliuri caracteristice acestor bacterii. (Fig.4).

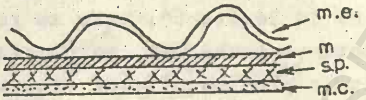


Fig.4. Reprezentare schematică a peretelui celular la bacteriile Gram-negative.

La cele mai multe bacterii Gram-negative peptidoglicanul formează un complex cu lipidele, el fiind situat în zona mediană a peretelui celular.

Membrana externă a peretelui celular este alcătuită din fosfolipide, proteine şi lipopolizaharide dispuse în aşa fel încît să asigure funcţionalitatea sa.

Datorită rigidităţii sale peretele celular determină forma celulei, iar datorită permiabilităţii sale selective protejează celula de şocurile osmotice. Este binecunoscut că presiunea osmotică intracelulară la multe microorganisme este cuprinsă între 5-30 atm. şi creşte cu creşterea dimensiunilor celulei. La o presiune osmotică atît de mare, fără suportul rigid al peretelui celular membrana citoplasmatică n-ar putea rezista.

Peretele celular participă totodată la procesele de multiplicare celulară, urmînd traiectul membranei plasmatice în formarea septului transversal de diviziune.

La nivelul său sînt localizate o serie de enzime hidrolitice cu rol în procesele de nutriţie celulară.

Deci, am putea considera peretele celular o adevărată "sită" moleculară, cu rol deosebit de important în viaţa celulei.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.3.2. Spaţiul periplasmatic

Spaţiul periplasmatic este un compartiment întîlnit numai la bacteriile Gram-negative. El este delimitat spre interiorul celulei de membrana citoplasmatică, iar spre exterior de un strat ce acţionează ca o sită moleculară, ce corespunde membranei externe a peretelui celular.

In spaţiul periplasmatic îşi au sediul unele enzime cum ar fi: fosfataza alcalină, acidhexozofosfataza, fosfodiesteraza ciclică şi numeroase enzime hidrolitice. Pe lîngă enzime, spaţiul periplasmatic mai conţine o serie de proteine neenzimatice aşa zisele "proteine de legătură", care au rolul de a lega specific diferite substanţe (zaharuri, aminoacizi, ioni anorganici etc), transportîndu-le pînă la nivelul proteinelor de transport de la nivelul membranei plasmatice.

Spaţiul periplasmatic prin echipamentul enzimatic pe care îl posedă, îndeplineşte importante funcţii în pregătirea chimică a substanţelor care difuzează prin membrana externă şi urmează să fie transportate prin membrana plasmatică, în citoplasmă.

Spre deosebire de bacteriile Gram-negatice, bacteriile Gram-pozitive, ce sînt lipsite de spaţiul periplasmatic, eliberează cea mai mare parte a enzimelor lor în afara celulei, în mediul de cultură.

1.3.3. Membrana plasmatică

Cunoscută şi sub numele de membrana citoplasmatică, membrana plasmatică reprezintă acea formaţiune structurală care acoperă de jur împrejur citoplasma celulară, interpunîndu-se între aceasta şi peretele celular.

Membrana plasmatică aderă intim cu peretele celular datorită diferenţei de presiune osmotică dintre mediul extern şi mediul intern. Ea poate fi evidenţiată şi la microscopul optic prin tehnici de colorare selective.

Membrana plasmatică are o grosime de 50-55 Å şi este formată din trei straturi de grosimi aproximativ egale, stratul intermediar fiind mai puţin opac faţă de electroni.

Prin tehnici de microscopie electronică (tehnica de îngheţare-fracturare) s-a arătat că membrana plasmatică prezintă spre citoplasmă un strat intern pe suprafaţa căruia se găsesc numeroase ridicături, uniform distribuite, ce corespund protein - enzimelor care traversează membrana.

Foiţa externă a membranei plasmatice este adiacentă stratului de peptidoglican de care se leagă structural şi funcţional.

Intre cele două foiţe: foiţa internă şi cea externă se află stratul intermediar mai gros şi mai puţin dens..

Din punct de vedere molecular, membrana plasmatică prezintă o structură tipică membranelor biologice (Fig.5). Componenţii moleculari ai membranei plasmatice sînt astfel structuraţi, încît aceasta să-şi poată îndeplini rolul său de membrană selectivă.

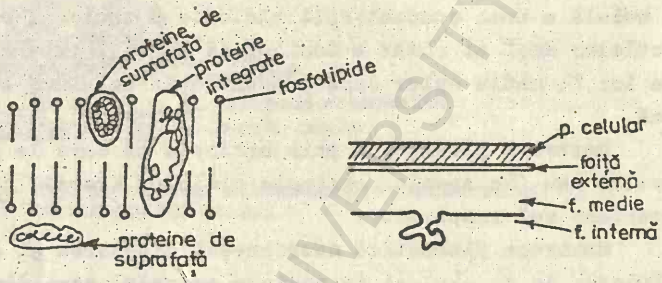


Fig.5. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a membranei plasmatice.

Componenţii moleculari lipidici, reprezentaţi de fosfolipide formează un film în care plutesc proteinele globulare, în timp ce glucidele interacţionează fie cu fosfolipidele fie cu proteinele.

Fosfolipidele membranare reprezintă o extremitate polară hidrofilă, alcătuită dintr-o grupare fosfat (PO_4^-) şi alţi constituenţi legaţi printr-o moleculă de glicerol, ce constituie regiunea nepolară , cu proprietăţi hidrofobe. Fosfolipidele formează un dublu strat.

Proteinele membranare, în raport cu poziţia lor în structura membranei sînt de două tipuri:

a)proteine integrate, în general insolubile în apă şi nu pot fi îndepărtate fără ruperea dublului strat lipidic-

b)proteine de suprafaţă, neînserate în dublul strat lipidic, sînt în general hidrosolubile şi dispuse fie pe faţa externă, fie pe cea internă şi sînt legate de regulă de proteinele integrate.

Glucidele reprezintă componentul cel mai slab reprezentat în structura membranei, ele fiind reprezentate la acest nivel de polizaharide legate de proteine (glicoproteine) sau reacţionează puternic cu anumite lipide formînd stratul de glicolipide membranare.

Membrana plasmatică reprezintă singura suprastructură citoplasmatică permanentă a celulei. Ea este o structură funcţională ce asigură o deosebire netă între exteriorul şi interiorul celulei; este bariera osmotică de permiabilitate care permite pătrunderea în celulă şi eliminarea selectivă a componenţilor metabolici celulari. Tot ea este aceea care permite menţinerea în celulă a unei concentraţii ridicate a macromoleculelor, a moleculelor mici şi chiar a ionilor (K^+,Mg^{2+}), nepermiţînd difuzarea lor în mediu chiar dacă concentraţia celulară este mult mai mică.

Membrana plasmatică prin enzimele pe care le prezintă la nivelul său (în special enzimele ciclului Krebs), joacă şi un important rol respirator.

Membrana plasmatică coordonează creşterea şi diviziunea celulară; la nivelul ei ia naştere semnalul care declanşează iniţierea replicării cromozomului bacterian.

1.3.4. Mezosomii

Mezosomii reprezintă un sistem membranos intracelular format prin invaginarea membranei plasmatice de care sînt legaţi intim (Fig.6).

Greenawalt (1975) arăta că mezosomii sînt asociaţi fizic şi/sau topografic cu replicarea şi segregarea cromozomului, cu formarea septului de diviziune şi cu sporularea.

Au fost descrise trei tipuri de mezosomi:

1. lamelari, care se formează prin plierea membranei plasmatice şi invaginarea ei;

2. veziculari sau saciformi, cu forme de vezocule aproape saciforme;

3. tubulari, de forma unor tubuli bine conturaţi.

Mezosomii au caracteristicile structurale ale membranei plasmatice din care derivă. Sînt mai numeroşi şi mai bine dezvoltaţi la bacteriile Gram-pozitive, pe cînd la bacteriile Gram-negative sînt greu de observat, fiind, în general, rudimentari, slab dezvoltaţi ca mărime şi mai puţini ca număr.

Prin expunerea în medii hipotonice, mezosomii sînt extrudaţi în spaţiul dintre membrană şi peretele celular sub forma unor filamente, care pot ajunge la dimensiuni de 20 nm.

Formarea mezosomilor începe cu invaginarea membranei plasmatice şi sfîrşeşte cu legarea sa de genomul bacterian. Formarea mezosomilor are loc, în general, în zona în care creşterea

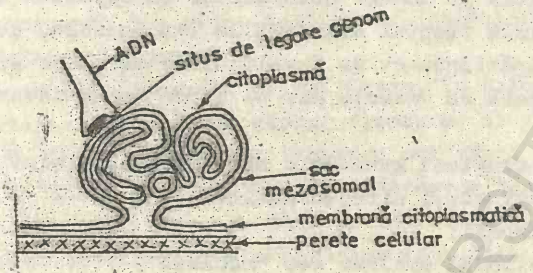


Fig.6. Reprezentarea schematică a mezosomului şi a conexiunilor sale.

membranei se face mai repede ca a peretelui celular, ceea ce are drept consecinţă invaginarea acesteia sub forma unei pungi pline cu membrane.

S-a considerat mult timp că mezosomii nu ar avea alte funcţii decît cele ale membranei plasmatice. In ultimul timp s-a aflat că mezosomii participă la reacţiile de fosforilare, oxidoreducere şi transport de electroni, însă ponderea tuturor acestor fenomene este mult mai mică ca în membrana plasmatică.

Prin echipamentele enzimatice pe care le conţin, mezosomii ar putea fncţiona ca organite subcelulare degradative. La nivelul lor s-au descoperit fosfataze acide, esteraze precum şi alte enzime cu rol în metabolismul celular.

Mezosomii joacă şi importante roluri în procesele secretorii, ca de exemplu în producerea şi eliberarea unor exoenzime. Mezosomii ar putea fi implicaţi şi în sinteza învelişurilor celulare, în mod particular al membranei citoplasmatice, a peretelui celular şi al septului transversal de diviziune celulară.

1.3.5. Citoplasma

Citoplasma bacteriană este considerată, în general, un sistem coloidal complex format din proteine, glucide, lipide, apă şi substanţe minerale.

Citoplasma bacteriană nu are o organizare structurală definită, similară celei din celulele de eucariote, care conţin organite diferenţiate şi delimitate de membrane. Aspectul ei este variabil în funcţie de vîrsta culturii şi de condiţiile de mediu. La celulele tinere şi în condiţii optime de creştere citoplasma aderă de învelişurile celulei şi se prezintă ca o masă densă, omogenă şi intens colorabilă. La celulele bătrîne, citoplasma îşi pierde treptat afinităţile tinctoriale, se retractă centripet, îndepărtîndu-se de învelişurile celulare şi capătă o structură granulară cu vacuole din ce în ce mai evidente la microscop.

In această structură granulară nediferenţiată sînt înglobate următoarele structuri citoplasmatice:

1. ribosomii;
2. materialul nuclear sau "nucleul";
3. incluziunile plasmatice;
4. vaculeolele;
5. alţi constituenţi.

O caracteristică a citoplasmei este prezenţa unei mari cantităţi de ARN, ce face ca ea să prezinte intense proprietăţi bazofile, proprietăţi ce sînt mai evidente la celulele tinere. Celulele moarte ca şi celulele bătrîne se colorează mai puţin intens, deoarece la acestea sinteza de ARN a încetat, iar cel existent a fost folosit ca sursă de azot şi fosfor.

1.3.6. "Nucleul"

Celula bacteriană fiind o celulă procariotă nu posedă un nucleu veritabil cu membrană proprie şi un număr determinat de cromozomi. "Nucleul" bacterian este o formă primitivă de organizare a materialului genetic, el este inclavat direct în citoplasmă în mod obişnuit în partea centrală a celulei. Evidenţierea sa la microscopul fotonic nu se poate face prin colorare selectivă decît după îndepărtarea ARN.

Forma "nucleului" la bacterii este diferită: sferică sau ovală, sub formă de haltere sau bastonaşe izolate dispuse în "V" sau sub forma unor filamente axiale. El reprezintă 5-16% din volumul celulei uscate.

La multe bacterii "nucleul" este, în general sub forma unui filament răsucit şi format dintr-o singură moleculă de ADN de formă circulară (cu extremităţile reunite). Lungimea filamentului este de 1400 µm, iar diametrul de 2,5 nm, dimensiune ce

corespunde unei molecule de ADN dublu catenară.

In prezent nu se cunoaşte modul în care această moleculă imensă depăşeşte de aproximativ 1000 ori lungimea lineară a celulei. Prin împachetarea sa se formează un corp cromatic de 1500 ori mai mic decît propria sa dimensiune în stare deformată.

Structura primitivă a "nucleului" bacterian, precum şi lipsa membranei proprii, permite un contact direct între molecula de ADN, ARN şi ribosomii din citoplasmă şi în consecinţă un transfer rapid de informaţie genetică.

In condiţii normale de cultivare, în faza staţionară, celula bacteriană posedă un singur cromozom. In faza de multiplicare activă, în celulă se pot distinge mai mulţi cromozomi (2-4) care sînt, însă, genetic identici, deoarece provin din replicarea cromozomului unic. Aceasta face ca bacteriile să fie considerate ca organisme esenţialmente haploide (n). Nici chiar atunci cînd celula primeşte un aport de material nuclear exogen, prin procese de transfer genetic, diploidia nu este decît parţială şi tranzitorie.

La bacterii nu se întîlnesc procese specifice de multiplicare a materialului nuclear, aici cromozomul se replică în două molecule egale, identice din punct de vedere genetic, care apoi se separă una de alta.

Cromozomul bacterian poartă în structura sa informaţia genetică necesară desfăşurării normale a proceselor energetice, biosintetice, creşterii şi dezvoltării precum şi de reglare a activităţii celulare. El este acela care determină arhitectura, ereditatea şi capacitatea de evoluţie a celulelor bacteriene.

1.3.7. Ribosomii

Ribosomii sînt particule nucleoproteice intracitoplasmatice de formă aproximativ sferică, avînd un diametru de circa 20 nm.

Citoplasma celulelor tinere, în faza activă de multiplicare, pe medii bogate, conţin un număr foarte mare de ribosomi. Numărul lor la procariote este de 15.000-100.000.

Din punct de vedere chimic, ei conţin ARN în proporţie de 60% şi proteine 40%. ARN ce intră în structura ribosomilor este cunoscut sub numele de ARN ribosomal (ARN_r) şi este de trei tipuri: ARN_r-16 S; ARN_r-23 S şi ARN_r-5 S (S = constanta de sedimentare).

Ribosomii au constanta de sedimentare 70 S, dar în faza creşterii active, prezintă tendinţa de a disocia în două componente de sedimentare: componenta 30 S şi componenta 50 S. Componenta sau subunitatea 30 S este formată din ARN_r-16 S şi 20-21 molecule de proteine diferite, în timp ce componenta sau subunitatea 50 S este formată din ARN_r-23 S şi ARN_r-5 S la care se asociază 27 - 35 molecule de proteine diferite (Fig.7).

In celulele intacte ribosomii pot fi liberi în citoplasmă sau pot forma agregate de mărimi variabile, cunoscute sub numele de poliribosomi. La unele specii bacteriene (Bacillus cereus) acestea vin în contact direct cu sistemul membranar celular, fiind legaţi în special de faţa internă a membranei plasmatice.

Ribosomii sînt componenţii principali ai sistemului de traducere a informaţiei genetice, reprezentînd adevărate uzine de producere a proteinelor celulare. La nivelul lor se desfăşoară un ansamblu de reacţii care formează ciclul ribosomal, prin care se iniţiază lanţul polipeptidic. In acest ciclu ribosomii interacţionează cu ARN_m pentru a secvenţionaliza şi lega aminoacizii în molecula proteică.

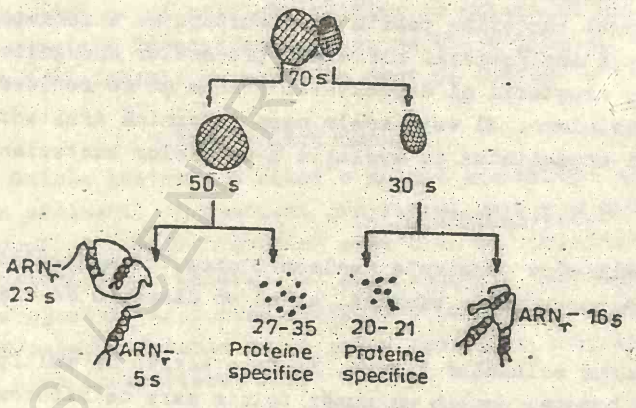


Fig.7. Reprezentarea schematică a modului de disociere a ribosomului bacterian.

Ciclul ribosomal se poate desfăşura numai atunci cînd cele două subunităţi sînt asociate şi combinate cu ARN_m ca şi cu ARN_t şi unele proteine.

In cursul proceselor de biosinteză, ribosomii individuali au tendinţa de a se grupa în şiruri lineare, interacţionînd cu ARN_m. Ribosomii astfel grupaţi se deplasează de-a lungul moleculei de ARN_m permiţînd lanţului polipeptidic să crească progresiv în lungime, odată cu deplasarea ribosomilor spre extremitatea terminală.

1.3.8. Incluziuni citoplasmatice

Incluziunile sînt formaţiuni inerte care apar în citoplasmă la sfîrşitul perioadei de creştere a celulei. Prezenţa sau absenţa lor variază în funcţie de condiţiile de mediu.

In funcţie de substanţele chimice ce le alcătuiesc, incluziunile pot fi:

a) incluziuni cu polimeri organici, cum ar fi incluziunile de glicogen, amidon, poli-beta-hidroxibutirat;

b) incluziuni de polimeri anorganici, cum ar fi incluziunile de polimetafosfat;

c) incluziuni anorganice simple, cum ar fi granulele de carbonat de calciu şi de sulf coloidal.

Incluziunile plasmatice pot fi înconjurate şi delimitate de membrane modificate, derivate din membrana plasmatică, (de exemplu, incluziunile de poli - beta - hidroxibutirat, de sulf şi carbonat de calciu) sau nu pot fi delimitate de astfel de membrane (de exemplu, incluziunile de glicogen şi volutină)

Incluziunile de poli-beta-hidroxibutirat au trezit în ultimul timp un interes deosebit pentru microbiologie şi biotehnologie, deoarece se consideră că acestea ar putea deveni o sursă importantă si neconvenţională de polimeri organici. Ei sînt prezenţi la multe celule microbiene care au proprietatea de a-i produce în proporţie de aproximativ 60% din greutatea lor uscată. Aceşti polimeri apar, în special, la celulele bătrîne a căror creştere a fost limitată prin sursa de azot şi crearea unui excedent în sursa de carbon.

Indiferent de natura lor chimică, incluziunile plasmatice au rolul, în celulă de substanţe de rezervă. Rezervele de substanţe acumulate la nivelul lor vin şi contrabalansează pentru o perioadă de timp eventualele dezechilibre metabolice apărute la nivelul celulei.

1.3.9. Vacuolele

Vacuolele sînt formaţiuni citoplasmatice care apar în număr variabil în perioada creşterii active a celulei microbiene, ele fiind mai puţin refrigente ca citoplasma. La exterior sînt delimitate de un înveliş lipoproteic unistratificat, numit tonoplast, iar în interior conţin apă în care sînt dizolvate diferite substanţe.

Se presupune (Knaysi, 1951) că vacuolele se formează ca rezultat al pătrunderii în celulă a unei cantităţi de apă în exces, care apoi se separă în picături în care se dizolvă produşii de metabolism hidrosolubili, în timp ce lipidele şi proteinele acumulate în jurul acestora ar forma tonoplastul.

Vacuolele în celulă îndeplinesc roluri de reglare a presiunii osmotice şi de depozit a unor substanţe de rezervă, în perioada premergătoare formării incluziunilor plasmatice.

1.3.10. Cromatoforii

Cromotoforii sînt formaţiuni citoplasmatice întîlnite la bacteriile fotosintetizante purpurii. Ei sînt formaţiuni sferice avînd aspectul de vezicule sau lamele, înconjurate de membrane ce delimitează în interiorul lor bacterioclorofilă, pigmenţi carotinoizi, proteine, polizaharide, fosfolipide, citocromi şi o cantitate relativ mare de fier neheminic, acidosolubil.

Numărul cromatoforilor în celulă este în raport invers proporţional cu intensitatea luminii şi direct proporţional cu cantitatea de bacterioclorofilă.

1.3.11. Sporul bacterian

Sporul este o formaţiune primitivă de diferenţiere celulară, ce apare în mod constant la formele vegetative ale unor bacterii anaerobe ce aparţin genului Clorstidium, dar şi în mod facultativ la bacteriile aerobe ce aparţin genului Bacillus. Sporul bacterian poate fi şi o formă de repaos ce poate să apară la multe alte specii bacteriene, în condiţii nefavorabile de mediu.

In lumea bacteriană se pot întîlni o mare varietate de forme sporale, care într-o formă sintetică se pot grupa în următoarele tipuri:

a) sporul endogen (endosporul), reprezintă forma cea mai caracteristică pentru bacterii. El apare în interiorul unei celule vegetative, ca o formaţiune foarte refrigentă, dotată cu mare

rezistență la condițiile nefavorabile de mediu.

b)artrosporul, este o formațiune sporală intracelulară cu o mai mică rezistență decît endosporul, dar superioară formei vegetative. El se formează prin fragmentarea celulei vegetative. A fost descris la specii ale genului Bacillus (Bacillus megaterium).

c)oidiosporii, sînt spori formați prin fragmentarea întregului miceliu în forme cocoide sau bacilare.

d)chiștii, reprezintă stadii de repaos sau de supravețuire, formați ca răspuns la modificările din mediu. Ei provin din transformarea unei celule vegetative în întregul ei, prin îngroșarea pereților și acumularea de material de rezervă.

e)gonidia, apare intracelular prin contracția, condensarea și fragmentarea protoplastului unei celule vegetative. De regulă apar mai multe gonidii mici care, după ruperea peretelui celulei în care se formează (gonidangiu)se eliberează în mediu.

1.3.11.1. Morfologia sporului

Sporul bacterian tipic (endosporul) este o formațiune sferică sau ovală, refrigentă cu dimensiuni variabile după specia și chiar în cadrul aceleiași specii, în funcție de vîrsta culturii și condițiile de mediu.

La unele specii diametrul sporului poate depăși diametrul transversal al celulei, ceea ce determină deformarea acesteia.

Așezarea sporului în celulă, variabilă la unele bacterii, constantă la altele, este un criteriu taxonomic. Sporul poate să ocupe poziție centrală, subterminală sau terminală.

Numărul sporilor în celula bacteriană este de unul și în mod excepțional s-au descris bacterii cu doi sau mai mulți spori.

Evidențierea sporului bacterian se poate face prin propria sa colorare cu coloranți energici ce au capacitatea să penetreze învelișurile sporale, sau prin colorarea celulei cu coloranți speciali.

1.3.11.2.Structura sporului

Din punct de vedere structural, nu se constată diferențe frapante în structura sporului de la diferite specii.Eventualele diferențe, se referă doar la gradul de organizare a învelișurilor lor externe.

In structura unui spor bacterian se pot distinge următoarele componente structurale.(Fig.8).

a) învelişurile (tunicile) sporale, sînt reprezentate prin trei straturi suprapuse: unul extern - exina - , unul intern - intina - şi unul mijlociu între cele două.

b) cortexul, este o zonă transparentă, mai puţin densă, în structura sa intră peptidoglicanul celular care a suportat o serie de modificări chimice şi acidul dipicolinic responsabil de termorezistenţa sporului.

c) membrana sporală care nu este altceva decît membrana plasmatică a celulei vegetative.

d) sporoplasma, reprezintă 60-70% din greutatea uscată a sporului. Ea este constituită din particole granulare ce corespund ribozomilor şi materialului nuclear al celulei vegetative. In sporoplasmă se mai găseşte ARN_r, dar lipseşte ARN_m.

La unele bacterii în afară de aceste elemente, la exteriorul exinei, se mai poate întîlni un strat mucos sau alte formaţiuni structurale a căror natură nu este cunoscută încă.

Din punct de vedere chimic sporul conţine, în general, aceiaşi componenţi ca şi celula vegetativă, dar în raporturi diferite.

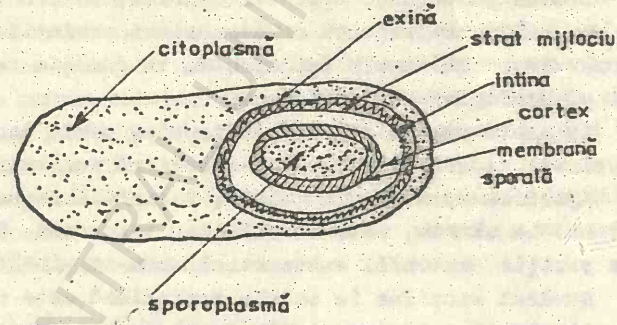


Fig.8. Reprezentarea schematică a structurii interne a sporului bacterian (după Kwapinski,1974).

Sporul este mai bogat în ioni de calciu (Ca^{2+}) şi magneziu (Mg^{2+}) şi mai sărac în ioni de potasiu (K^{+})şi fosfor. El este mai sărac în enzime, iar cele care există sînt inactive.

1.3.11.3. Germinarea sporului

Germinarea sporului reprezintă fenomenul de transformare a sporului în celulă vegetativă. Acest proces de transformare se realizează în trei faze distincte:

1. faza de activare a sporului;
2. faza de iniţiere a germinării;
3. faza de creştere postgerminativă.

1.Faza de activare este un proces reversibil şi nu întotdeauna obligatoriu. Mecanismul de activare, în general, nu este cunoscut, însă se presupune că în condiţii propice de temperatură, umiditate, pH, necesităţi nutritive, sporul suportă o serie de modificări structurale şi moleculare, care în final conduc la germinarea sa.

2.Faza de iniţiere a germinării, constă în apariţia unor modificări morfologice şi chimice ce fac ca sporul să-şi modifice volumul, să-şi piardă refrigenţa, iar contextul şi tunicile sporale îşi pierd rezistenţa.Acidul dipicolinic şi produşii de hidroliză a peptidoglicanului se elimină în mediu.

3.Faza de creştere postgerminativă durează pînă în momentul în care celula vegetativă rezultată din spor intră în multiplicare (prima diviziune). Creşterea postgerminativă necesită prezenţa unor substanţe nutritive pe baza cărora se vor desfăşura importante procese metabolice specifice celulei vegetative. Creşterea postgerminală constă în formarea unei celule vegetative în centrul sporului, unde ribosomii şi materialul nuclear îşi reiau activitatea,determinînd creşterea celulei deja formate.

Creşterea postgerminativă este însoţită şi de modificări moleculare.Acum apare ARN_m şi începe sinteza proteinelor. Se sintetizează de asemenea principalele enzime necesare desfăşurării căilor metabolice specifice.

1.3.12.Capsula şi stratul mucos

Unele bacterii au proprietatea de a secreta, în anumite condiţii de mediu, un material macromolecular cu caracter vîscos şi gelatinos pe care îl dispun în jurul corpului celular, formînd capsula. Atunci cînd el este slab ataşat de celulă formînd o pătură mai mult sau mai puţin difuză, el structurează stratul mucos.

Atît capsula cît şi stratul mucos pot fi puse în evidenţă la microscopul fotonic, prin colorare cu tuş China.

Din punct de vedere chimic atît capsula cît şi stratul mucos sînt constituite din polizaharide şi polipeptide, separate unele de altele sau formînd complexe moleculare.

Capsula şi stratul mucos nu sînt formaţiuni celulare permanente şi esenţiale, deoarece o specie capsulată poate să prezinte şi tulpini necapsulate.

1.3.13. Flagelii

Flagelii sînt apendici filamentoşi dispuşi numai la suprafaţa celulei bacteriene, reprezentînd organele de locomoţie a acesteia. Ei se întîlnesc numai la bacteriile ciliate, bacili şi spirili şi mai rar la coci. Numărul şi poziţia lor este specifică fiecărei specii şi prezintă valoare taxonomică.

La bacteriile ciliate numărul cililor este de 1-30, dispuşi polar sau pe toată suprafaţa celulei. Sînt mai răspîndiţi la celulele bătrîne şi la cele care trăiesc în medii lichide.

Forma lor tipică este cilindrică, iar diametrul uniform pe toată lungimea filamentului.

Din punct de vedere structural, flagelii sînt alcătuiţi în 3 părţi (Fig.9): corp, cîrlig şi filament.

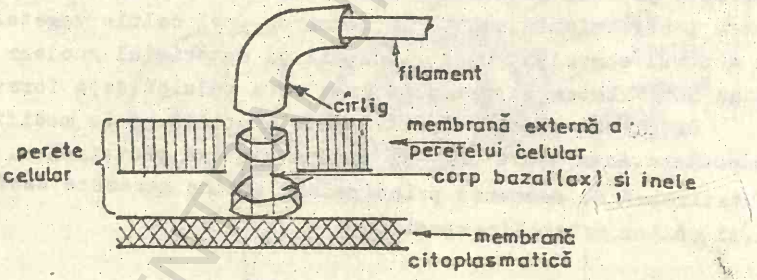


Fig.9. Reprezentarea schematică a structurii flagelului şi a modului în care se fixează de celulă.

-Corpul falimentului sau corpul bazal este porţiunea cea mai importantă, deoarece funcţionează ca un motor rotativ al cărui ax de transmisie este conectat cu falimentul printr-un cîrlig care serveşte ca articulaţie flexibilă. Pe axul corpului sînt fixate mai multe inele prin intermediul cărora se ancorează flagelul de peretele celular.

-Cîrligul este reprezentat printr-un manşon ce face legătura între axul corpului bazal şi filamentul flagelului.

-Filamentul flagelului este porţiunea liberă care antrenează celula în mişcare. Creşterea sa se face prin porţiunea terminală, unde o substanţă specială, flagelina, este sintetizată în celulă, de aici prin canalul central al flagelului ajunge în vîrful său unde este dispusă simetric asigurînd creşterea.

Flagelul este acea formaţiune structurală care asigură deplasarea bacteriilor în mediile lichide. Mişcarea celulei prin intermediul flagelului se face astfel: filamentul este pus în mişcare prin rotirea axului cu inele care transmite mişcarea la cîrligul de legătură, iar acesta imprimă filamentului mişcări de rotire în jurul propriului său ax, propulsînd în felul acesta celula.

1.3.14.Pili şi fimbrii

Pilii şi fimbriile sînt apendici filamentoşi, pericelulari, întîlniţi în special la bacteriile Gram - negative. Fiind prea subţiri nu pot fi observaţi la microscopul optic, însă sînt observabili la microscopul electronic.

Din punct de vedere structural şi funcţional ei trebuie trataţi ca două formaţiuni distincte.

Pilii cunoscuţi în literatură şi sub denumirea de pili de sex, sînt apendici filamentoşi, neflagelaţi, reprezentînd calea efectivă de transfer a materialului genetic în procesele de conjugare celulară. Ei pot să acţioneze şi ca receptori specifici de fagi.

Fimbrii sînt apendici celulari neflagelaţi care nu sînt implicate în procesele genetice de transfer.Rolul lor este limitat la mărirea suprafeţei de absorbţie a celulei, la creşterea proceselor respiratorii şi într-o oarecare măsură la fixarea celulei de substrat.

2.Tipuri particulare de bacterii

In marele grup al bacteriilor intră o serie de microorganisme care se abat de la tipul clasic, generic, prezentînd o serie de proprietăţi care fac ca ele să fie considerate un grup de bacterii particulare.

In acest grup de bacterii intră: rickettsiile, micoplasmele, formele "L", chlamidiile, spirochetele, mixobacteriile,

actinomicetele şi cianobacteriile. Dintre toate acestea actinomicetele şi mixobacteriile prezintă interes industrial, ele fiind tratate şi în cursul de faţă.

2.1. Actinomicetele

Actinomicetele sînt microorganisme cu o structură particulară ce aparţin marelui grup de bacterii. Ele sînt una dintre grupele de microorganisme cu mare aplicabilitate în industria de biosinteză. Sînt răspîndite în natură în special în sol, dar se întîlnesc şi în alte medii naturale.

Compoziţia chimică a peretelui celular, absenţa membranei nucleare, parazitarea lor de către bacteriofagi a determinat pe mulţi specialişti să le considere bacterii, dar cu structură particulară. Spre deosebire de toate bacteriile generice ele sînt microorganisme filamentroase, tranzitoriu sau constant filamentoase, cu celulele ramificate formînd hife, formaţiune structurală întîlnită la ciuperci, ce a făcut ca mulţi specialişti să le considere ciuperci. Toate sînt Gram-pozitive şi prezintă o mare varietate de tipuri morfologice. Formaţiunea lor structurală şi morfologică este hifa. Prin creşterea şi ramificarea acesteia, actinomicetele formează structuri morfologice cunoscute sub numele de miceliul.

Toate actinomicetele, cu excepţia formelor celor mai simple care au structură tipic bacteriană, formează colonii complexe miceliene multinucleate. Pe astfel de colonii se pot diferenţia hife care joacă roluri vegetative şi hife cu roluri reproductive

2.1.1. Morfologia actinomicetelor

Unele actinomicete, în special cele de aparţin genului Actinomyces formează în mod obişnuit celule mici bacilare cu tendinţă de a forma rare filamente ramificate. Cele mai multe actinomicete au, însă o formă alungită, filamentoasă, cu tendinţă marcantă de ramificare constituind acea formaţiune morfologică şi structurală, miceliu. (Fig.10 şi 12).

Filamentele micelului, hifele, au un diametru de 0,5-2,0 µm şi o lungime greu de definit. Hifele prezintă o structură tipic bacteriană, dar celulele ce le formează sînt foarte lungi, multinucleate, fără pereţi transversali, în special în

cursul creşterii vegetative. La unele specii hifele au tendinţa să se fragmenteze dînd formaţiuni bacilare sau cocobacilare, ce face ca observarea lor să fie posibilă numai în anumite stadii de dezvoltare. Pe medii agarizate actinomicetele formează colonii tipice (fig.11).

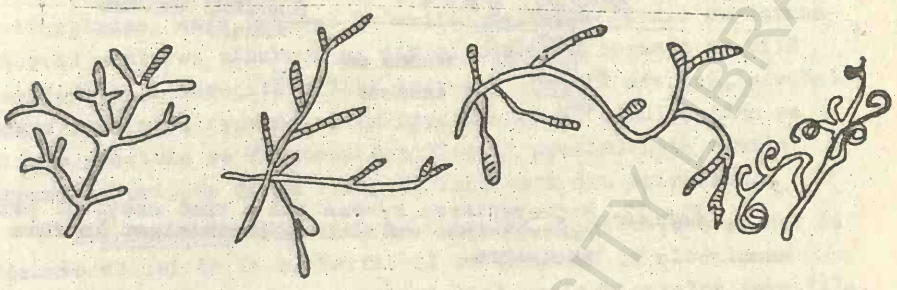


Fig.10. Fragmente de hife sporofore de actinomicete.

In secţiune transversală o colonie de actinomicet/ prezintă un miceliu aerian şi un miceliu de substrat (Fig.12).

Miceliul aerian are tendinţa de a forma spori, care apar atunci cînd substanţele din mediu nutritiv se epuizează, iar în acelaşi condiţii miceliul de substrat lizează şi celulele mor treptat şi în final şi colonia, rămînînd sporii, care, cînd condiţiile nutritive revin germinează formînd noi hife.

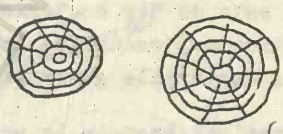


Fig.11. Colonii de actinomicete.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

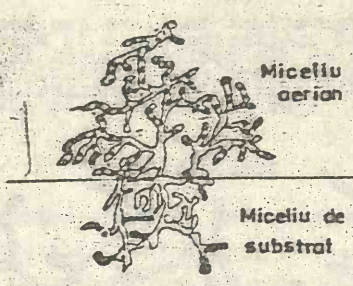


Fig.12. Reprezentarea schematică a unei secţiuni prin centrul unei colonii de actinomicet în faza de sporulare.

2.1.2. Structura internă a actinomicetelor

Structura internă a actinomicetelor este foarte asemănătoare cu cea a bacteriilor.

Citoplasma miceliul tînăr este omogenă, dar pe măsură ce acesta îmbătrîneşte, ea se diferenţiază în sensul că apar incluziunile meta cromatice, picăturile lipidice şi vacuolele.

"Nucleul" lor este de tip procariot, iar numărul lor în hifele miceliene este variabil. Sporii conţin însă un singur nucleu. In hifele bătrîne "nucleii" se aglomerează, formînd mase amorfe.

Mitocondriile lipsesc, dar membrana plasmatică prezintă mezosomi lamelari, veziculari sau tubulari.

Reticulul endoplasmatic lipseşte ca şi la bacterii.

Peretele celular este de tip bacterian.

Incluziunile plasmatice, vacuolele apar şi la aceste microorganisme ca şi la bacteriile generice.

2.1.3. Formaţiuni sporale la actinomicete

Actinomicetele formează spori ca organe de rezistenţă la condiţiile nefavorabile de mediu, dar care sînt şi organe de înmulţire a lor.

Sporii actinomicetelor sînt cunoscuţi în literatura de specialitate sub denumirea de actinospori. După Dworkin (1977) ei pot fi grupaţi în trei tipuri principale:

1. sporangiospori;
2. endospori;
3. spori hifali sau artrospori.

1.Sporangiosporii(Fig.13) au fost descrişi la specii de Actinoplanes, care trăiesc în mediul acvatic. Sporii se formează prin septarea sincronă şi diviziunea unui segment de hifă ramificată şi răsucită aflată într-o structură sferică, asemănătoare unui sac, sporangiu. La speciile cu miceliul aerian pe hifele acestuia se formează ramificaţii specializate numite sporangiofori, de formă dreaptă, încurbată sau spiralată.

2.Endosporii (Fig.14.) se aseamănă ca structură şi mod de formare cu cei de la bacterii. Ei se formează în citoplasma hifei parietale şi sînt caracteristici actinomicetelor termofile.

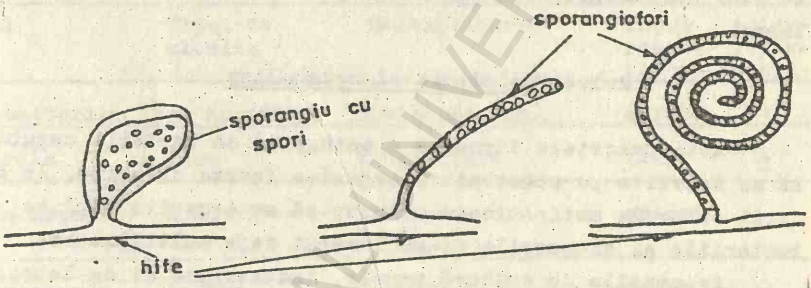


Fig.13. Tipuri de sporangi.

O caracteristică a lor este forma poliedrică, cu 12 feţe pentagonale şi 12 feţe hexagonale, fiecare uşor concavă.

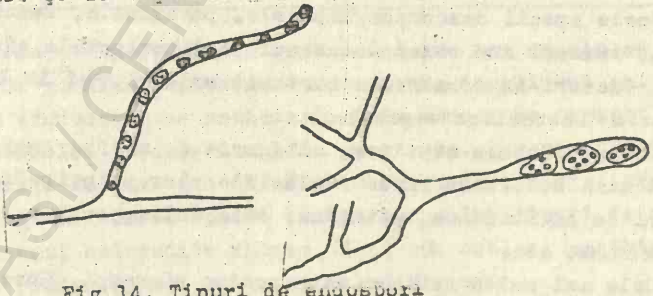


Fig.14. Tipuri de endospori

3.Sporii hifali sau artosporii.Iau naştere prin septarea hifelor terminale ce joacă rol de sporangiofor. După maturarea sporagelului se detaşează foarte uşor de hifa sporogenă formînd spori individuali (Fig.15).

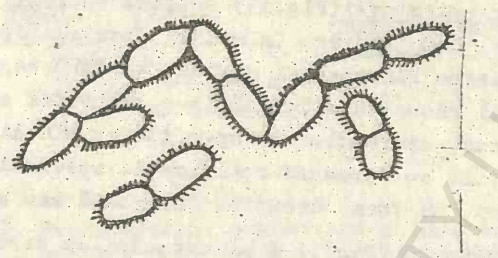


Fig.15. Spori hifali de actinomicete

Prin germinare sporii de actinomicete formează colonii ce sînt constituite din înţesarea şi concentrarea hifelor miceliene.

2.1.4.Fiziologie şi metabolism

Actinomicetele formează o categprie de bacterii capabile să se dezvolte pe substraturi organice foarte diferite. In condiţii naturale actinomicetele încep să se dezvolte după ce bacteriile şi ciupercile şi-au început deja multiplicarea.

Pe mediile de cultură uzuale, industriale şi de laborator, actinomicetele cresc bine dacă li s-a asigurat sursa de carbon azot şi fosfor. Ele utilizează atît azotul mineral cît şi cel organic, iar carbonul se utilizează sub formă de acizi organici, dextrine, amidon sau alţi compuşi zaharaţi.

Unele specii descompun lipidele, parafinele, fenolii, lignina, taninul sau chiar cauciucul. Actinomicetele sînt principalii factori în formarea structurii solului, şi în biodegradarea resturilor vegetale.

Actinomicetele sînt acea categorie de microorganisme cu cea mai mare utilizare industrială. Ele sînt principalii producători de antibiotice, vitamine, acid folic, auxine, aminoacizi, enzime, etc.

Cele mai multe actinomicete produc pigmenţi. Speciile pigmentate au miceliul aerian pigmentate în: galben, portocaliu, roşu, violet, albastru, verde, cenuşiu, etc. Uneori numai coloniele sînt colorate, alteori pigmentul difuzează în mediul de

cultură, colorîndu-l.

Metabolizarea substanţelor nutritive se face pe căi metabilice specifice celor mai multe bacterii. La formele industriale procesele metabolice se desfăşoară pe căi secundare, specifice substanţei de biosinteză. produsă.

2.1.5. Taxonomie

Toate bacteriile cunoscute sub numele de actinomicete sînt grupate în ordinul Actinomycetales, care cuprinde mai multe familii, genuri şi specii ce sînt redate în tabelul 3.

Tabelul 3

GENURI DE ACTINOMICETE SI PRINCIPALELE CARACTERISTICI ALE LOR

Genul	Tipul de miceliu	Multiplicarea	Tipul respirator	Acido-rezistenţă
Mycobacterium	de substrat	Diviziune dir.	aerob	+
Nocardia	Idem	Fragmentare	Idem	±
Actinomyces	Idem	Diviziune dir. Spori	anaerob	-
Streptomyces	aerian	Conidii	aerob	-
Micromonospora	de substrat	Idem	Idem	-
Actinoplanes	Idem	Sporangiospori	?	-

Fiecare dintre aceste genuri îşi are importanţa sa practică De exemplu genul Streptomyces are reprezentanţii cei mai importanţi în producerea de antibiotice. Se cunosc în prezent peste 500 antibiotice produse numai de acest gen. Aproximativ 50% dintre speciile izolate din diferite medii naturale sînt producătoare de antibiotice. Unele specii produc mai multe tipuri de antibiotice, deseori neînrudite chimic, după cum acelaşi antibiotic poate fi produs de mai multe specii diferite.

Reprezentanţi ai genurilor Micobacterium, Actinomyces, Nocardia şi Micromonospora produc la om şi animale infecţii viscerale sau cutanate.

2.2. Mixobacteriile

Mixobacteriile sînt microorganisme procariote care prezintă un ciclu de viaţă cuprinzînd secvenţe de dezvoltare complexă şi procese rudimentare de comunicare intracelulară (Dworkin,1975).

Reprezentanţii acestora sînt bacili Gram-negativi caracterizaţi prin două proprietăţi: una neobişnuită şi-alta unică la bacterii.

Trăsătura neobişnuită priveşte mobilitatea celulelor vegetative care se manifestă în absenţa flagelilor sau a oricăror alţi organe de locomoţie. Mişcările de locomoţie la aceste microorganisme se fac prin alunecare sau glisare. Ele pot fi executate numai atunci cînd celulele sînt în contact cu o suprafaţă solidă, sau la interfaţa aer-apă.

Trăsătura unică a actinomicetelor constă în capacitatea lor de a dezvolta un ciclu de viaţă ce implică fenomene de morfogeneză celulară şi colonială.

Acest grup de bacterii particulare par să ofere noi şanse microbiologiei industriale, în categoria lor intrînd specii producătoare de enzime, în special din clasa hidrolazelor şi antibiotice mai puţin cunoscute în prezent.

2.2.1. Morfologie

Celulele vegetative au forma unor bacili mici, uniform cilindrici cu extremităţile ascuţite, avînd structura celulară tipică bacteriilor Gram-negative. Nu posedă flageli. Celula vegetativă este inclavată într-un strat mucos mai mult sau mai puţin consistent.

Formează pe agar colonii plate care se răspîndesc radiar faţă de locul de inoculare. Marginea coloniei este foarte neregulată, deoarece celulele de aici se mişcă mult mai rapid decît cele din interior şi se desprind frecvent alunecînd în afara coloniei, pentru a se întoarce apoi din nou în corpul ei (fenomen de roire caracteristic mixobacteriilor).

Celulele sînt relativ groase, cilindrice, cu extremităţile teşite şi dimensiuni de 2,6 - 6 µm. Ele prezintă şi forme fusiforme cu celule subţiri şi celulele uşor ascuţite de 0,6 - 10 µm.

Celulele vegetative ale mixobacteriilor nu diferă semnificativ din punct de vedere chimic sau ultrastructural de bacteriile Gram-negative, la fel ca şi acestea au tendinţa de a forma sferoplaşti, fenomen ce apare ca răspuns la variaţiile condiţiilor

de mediu. Se colorează în general slab prin metode convenţionale şi se deformează la fixarea prin căldură, de aceea este indicată studierea lor la microscopul cu contrast de faze în forma lor vegetativă.

2.2.2. Multiplicarea şi ciclul de viaţă.

Spre deosebire de celelalte bacterii, mixobacteriile prezintă un ciclu de viaţă, pe care cale are loc multiplicarea şi supravieţuirea speciei. Modul lor de manifestare de-a lungul ciclului de viaţă este în strînsă dependenţă de natura mediului nutritiv. In raport cu acesta, ciclul lor de viaţă se poate desfăşura în mod diferit (Fig.16):

a) pe medii lichide complexe cresc sub formă de celule vegetative dispersate, care se înmulţesc (multiplică) prin diviziune binară transversală (timpul de generaţie este de 200-270 min.)-

b) pe medii solide, lipsite de un anumit nutrient sau adiţionate cu glicerol, precum şi atunci cînd densitatea celulelor este mare, mixobacteriile au tendinţa de a se agrega în mase proeminente de grupuri de celule care formează corpii de

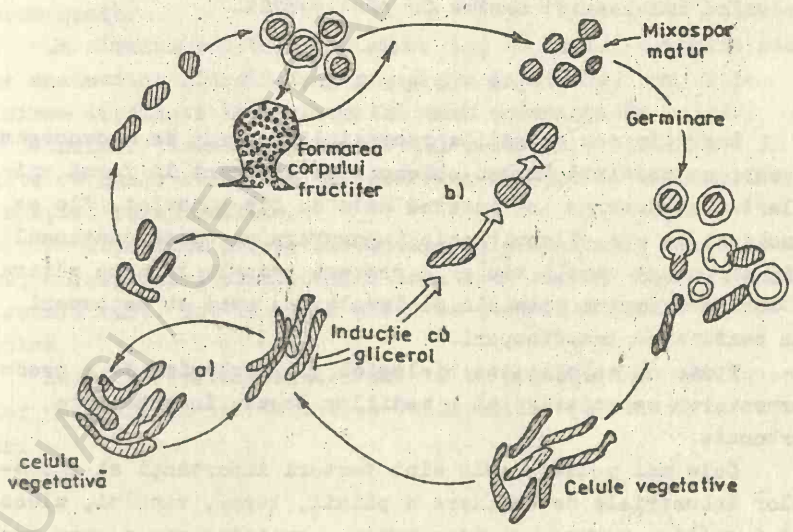


Fig.16. Ciclul de viaţă la mixobacterii (după Dworkin, 1973).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fructificare, la nivelul cărora celula vegetativă îşi pierde mobilitatea şi evoluează spre starea de latenţă. Corpii de fructificare sînt structuri rudimentare, multinucleate, macroscopice, de formă mărime şi culoare caracteristică fiecărei specii de mixobacterii. Corpii de fructificare formează mixospori sau mixichişti, acestea prin germinare pot genera un nou individ (celule vegetative).

2.2.3. Fiziologie şi metabolism

Mixobacteriile sînt organisme chemoheterotrofe, strict aerobe, care fac hidroliza extracelulară a unor macromolecule insolubile (amidon, celuloză, peptidoglicani, proteine, etc), a căror produşi de hidroliză sînt folosiţi pentru creştere. In general, se dezvoltă bine pe mediile cu hidrolizat de proteine şi săruri minerale.

Unele dintre mixobacterii sînt bacteriotrofe, avînd, deci, proprietatea de a omorî şi liza bacteriile sau chiar levurile şi ciupercile.

Căile lor metabolice sînt în general asemănătoare multor alte microorganisme.

Rolul lor în natură este corelat cu proprietatea de a hidroliza moleculele insolubile. Unele specii sînt patogene producînd îmbolnăviri masive în păstrăvării.

L E V U R I L E

Levurile sau drojdiile reprezintă un grup de microorganisme care se prezintă în mod obişnuit şi dominant în formă unicelulară. Organizarea lor internă este de tip eucariot. Ele se înmulţesc în mod obişnuit prin înmugurire şi numai ocazional prin diviziune simplă sau prin procese sexuale în urma cărora se formează organe speciale de înmulţire, asce cu ascospori sau bazidii cu bazidiospori.

Toate au capacitatea biologică şi biochimică de a produce fermentarea caracteristică a mediilor bogate în substanţe carbonate.

Cele mai multe specii sînt factori importanţi ai proceselor industriale de obţinere a pîinii, berei, vinului, alcoolului etilic, a unor vitamine, enzime, proteine sau a unor preparate alimentare îmbunătăţite.

1. Morfologie

Celula levuriană are în general formă sferică, ovală sau alungită. Unele sînt monomorfe, adică sînt formate din celule de un singur tip, în timp ce altele sînt dimorfe sau chiar polimorfe.

In afară de forma tipică, ovală, levurile mai pot prezenta şi alte forme: elipsoidale (Saccharomyces ellipsoideus), sferică (Torula), triunghiulară (Trigonopsis), apiculată, asemănătoare unei lămîi (Nadsonia), filamentoasă (Candida, Asbbya).

Mărimea celulei de drojdii este variabilă, de la specie la specie. Ea este în general cuprinsă între 4-8/7-12 μ m. Formele filamentoase pot atinge dimensiuni de 70/8-12 μm.

Suprafaţa celulei are valori medii de 118 μ^2, iar greutatea este de 1,3 x 10^{-10}g.

2. Structura internă

Ca orice organism eucariot, levurile şi ele sînt alcătuite din punct de vedere structural, din: perete celular, membrană plasmatică, citoplasmă şi constituienţi citoplasmatici (Fig.17).

-Peretele celular, ca înveliş extern celular are o grosime variabilă în raport cu condiţiile de cultivare. El este alcătuit din două sau trei straturi, constituite din polizaharide de tip glucomanan, chitină şi proteine legate de complexul glucomananic.

La nivelul peretelui celular îşi au sediul diferite sisteme enzimatice hidrolitice(de exemplu invertaza) sau unele permiaze implicate în transportul unor substanţe în celulă.

Enzimele localizate la nivelul peretelui celular pot fi legate de unele structuri ale acestuia sau pot să se acumuleze în spaţiul periplasmatic.

Pe suprafaţa peretelui celular se găsesc zone caracteristice, corespunzînd cicatricelor lăsate de muguri după desprinderea de celula mamă. Tot la acest nivel se poate întîlni o capsulă atipică.

Rolul peretelui celular constă în protejarea constituienţilor celulari şi în realizarea schimburilor cu mediul înconjurător.

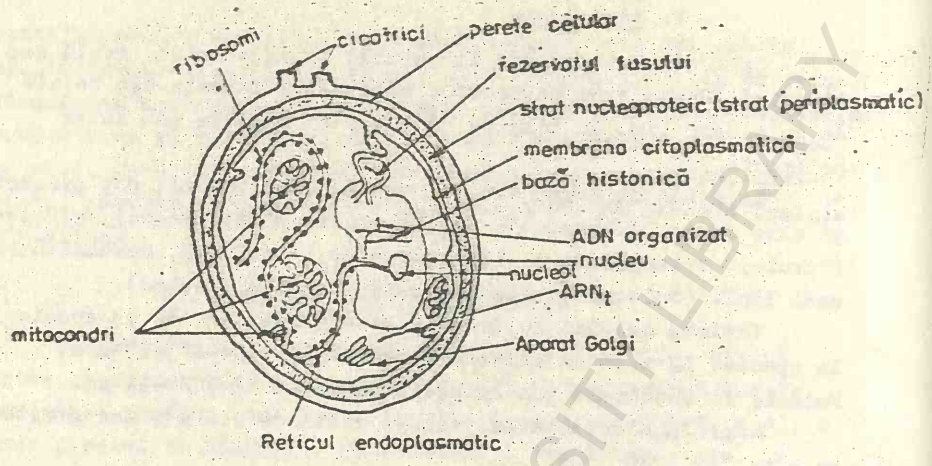


Fig.17. Reprezentarea schematică a structurii celulare la levuri.

-Spaţiul periplasmatic, are natură nucleoproteică cu rol nedefinit. La nivelul lui îşi au sediul o serie de sisteme enzimatice cu r- important în transportul şi hidroliza substanţelor nutritive.

-Membrana plasmatică, este cunoscută şi sub denumirea de plasmalemă, are o structură tristratificată cu un strat intern spre citoplasmă şi un strat extern spre spaţiul periplasmatic. Intre acestea se află stratul mijlociu mai gros decît primele două şi mai opac pentru electroni.

Din punct de vedere chimic membrana plasmatică are o structură lipoproteică, însă conţine şi ribonucleoproteine şi polizaharide.

La celulele bătrîne membrana plasmatică este ondulată spre spaţiul periplasmatic, ondulaţii ce pot să-i mărească pînă la 50% suprafaţa, aceasta probabil şi în legătură cu unele procese celulare de hidroliză şi transport.

-Citoplasma, reprezintă spaţiul în care sînt înglobate toate celelalte structuri celulare. Ea are un prag ridicat de vîscozitate, care la celulele bătrîne depăşeşte de peste 8.000 ori vîscozitatea apei. Această proprietate este dată de conţinutul ridicat de proteine, lipide, glucide şi nucleoproteine. Toate acestea au un înalt grad de vîscozitate ce în mod implicit măresc vîscozitatea citoplasmei.

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

-Reticulul endoplasmatic. Se prezintă ca un sistem membranos tubular, conectat cu membrana nucleară externă. După Moor (1967) el participă la procesele de multiplicare, avînd rol în declanşarea formării mugurilor pe cale enzimatică.

In strînsă legătură cu reticulul endoplasmatic se află ribozomii, care sînt piese importante în procesul de biosinteză.

Ribozomii sînt constituenţi citoplasmatici dominanţi, liberi sau fixaţi pe pereţii reticulului endoplasmatic.

-Mitocondriile.Sînt componenţi celulari la nivelul cărora au loc principalele procese metabolice legate de energetica celulară, aici are loc activarea aminoacizilor şi acizilor graşi implicaţi în procesele biosintetice. Tot la nivelul mitocondriilor are lor biosinteza principalelor enzime ale metabolismului celular.

In celulele tinere pe cale de creştere, mitocondriile sînt aproximativ cilindrice şi scurte, pe cînd la celulele mature ele sînt lungi şi groase. Din punct de vedere topografic ele sînt dispuse în apropierea membranei plasmatice, din care se consideră că au luat naştere.La exterior mitocondriile sînt delimitate de o membrană formată din două straturi: unul intern şi altul extern. Stratul intern se pliază în matricea mitocondriei, mărindu-i mult suprafaţa. Conţinutul intern mitocondrial are o structură granulară mai densă decît cea a citoplasmei. Numărul mitocondriilor într-o celulă poate să fie de 40-50 formaţiuni.

-Aparatul Golgi, deşi este bine structurat la levuri, totuşi rolul lui nu este bine definit.Se presupune că ar participa la desfăşurarea metabolismului lipidelor, sau la sinteza peretelui celular. Ceea ce este cert, el joacă un rol important în procesul de sporulare şi formarea mugurelui celulei levuriene. In celula de levuri el apare ca un complex de vezicule uşor de evidenţiat şi cu dispoziţie citoplasmică.

-Nucleul la levuri este de tip eucariot, fiind reprezentat printr-o formaţiune globulară delimitată la exterior de membrana nucleară dublu stratificată ,pe suprafaţa ei depistîndu-se circa 200 pori circulari, grupati cîte 10-15 pe μ^2.

Spre interior, membrana nucleară delimitează nucleoplasma în care se găsesc înglobaţi cromozomii şi nucleul, ce reprezintă formaţiuni structurale şi funcţionale tipice levurilor şi celor mai multe eucariote.

-Vacuolele, în celula levuriană sînt formaţiuni adia-

cente nucleului. Ele îşi au originea în reticulul endoplasmatic. Rolul lor în celulă este acela de reglatori ai presiunii osmotice prin înmagazinarea unor metaboliţi sau compuşi inerţi.

3. Fiziologie şi metabolism

Levurile folosesc ca sursă de carbon diferite zaharuri, acizi organici, glicerol, intermediari ai metabolismului lipidelor, iar ca sursă de azot produşii rezultaţi din hidroliza proteinelor, amoniacul, ureea, etc. Cele mai multe levuri necesită pentru creşterea şi dezvoltare factori de creştere: tiamină, biotină, inositol, piridoxină, acid pantotenic, etc. Cresc şi se dezvoltă foarte bine la temperaturi cuprinse între 20-30°C şi la pH-uri de 4,5-5,0.

In condiţii de anaerobioză levurile realizează fermentaţia alcoolică a zaharurilor cu producere de alcool etilic şi CO_2 conform reacţiei:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH + 66\ Kcal$$

In condiţii de aerobioză levurile oxidează complet zaharurile conform reacţiei:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 700\ Kcal$$

In aceste condiţii energia rezultată din metabolizarea glucozei se foloseşte în cantitate mică pentru procesele de asimilare a resturilor de substrat, cea mai mare parte folosindu-se în creşterea acumulărilor de substanţe celulare, deci a biomasei. Această comportare metabolică pregnant diferită în funcţie de prezenţa oxigenului este folosită în industrie, unde se crează după caz, condiţii de anaerobioză, atunci cînd se doreşte obţinerea de alcool etilic sau condiţii de aerobioză cînd se urmăreşte obţinerea de masă celulară.

4. Taxonomie

Levurile formează un grup relativ mic de microorganisme ce aparţin din punct de vedere sistematic ciupercilor. Din punct de vedere practic încercările de grupare a lor într-o ordine cît mai logică şi ştiinţifică n-a fost posibilă.

Gruparea lor, care în prezent este totuşi acceptată de mai mulţi autori, cuprinde trei familii cu numeroase genuri şi specii:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.Fam.Endomicetaceae, încadrează levurile care formează asce cu ascospori. Aici sînt incluşi toţi reprezentanţii clasei Ascomycetes.

2.Fam.Sporobolomycetaceae, încadrează levurile care formează bazidii cu bazidiospori şi cuprinde toţi reprezentanţii clasei Basidiomycetes.

3.Fam.Cryptococcaceae, încadrează levurile care formează spori (clamidospori) în ea fiind incluşi toţi reprezentanţii clasei Fungi imperfecţi.

F U N G I I

Fungii sau mucegaiurile sînt organisme filamentoase saprofite (care cresc pe substanţe intrate în putrefacţie şi nu produc boli) sau parazite (produc diferite boili). Ei se reproduc pe cale asexuată (fără participarea unor gameţi de sexe diferite) sau sexuat (cu participarea unor gameţi de sexe diferite). Sînt organisme cu o mare capacitate de adaptare la condiţiile variate, nefavorabile ale mediului în care îşi desfăşoară activitatea.Ele cresc în condiţii extreme de aciditate, presiune osmotică, uscăciune. etc. Au structura celulară de tip eucariot.

Aparatul lor vegetativ (formele de creştere şi dezvoltare) este diferit de la specie la specie. El poate fi:

1. un gimnoplast sau plasmodiu;
2. dermatoplast;
3. sifonoplast;
4. tal tipic.

1.Gimnoplastul sau plsmodiu este forma de existenţă a fungilor cu organizarea cea mai inferioară. El este alcătuit din dintr-o masă citoplasmatică multinucleată lipsită de perete celular rigid. Este caracteristic fungilor primitivi.

2.Dermatoplastul este aparatul vegetativ întîlnit la cele mai multe levuri. El este format dintr-o singură celulă cu perete celular rezistent, citoplasmă şi nucleu tipic eucariotelor.

3.Sifonoplastul este aparatul vegetativ întîlnit la multe ciuperci filamentoase. El este alcătuit din numeroase filamente subţiti cunoscute sub numele de hife din a căror împletire rezultă miceliu. Hifele miceliene au formă tubulară, sînt rigide, prezentînd diametre relativ egale pe toată lungimea lor. La exterior sînt delimitate de peretele hifal, rigid, iar în inte-

riorul hifei se află citoplasma în care sînt înglobaţi nucleii. La aceste ciuperci numărul nucleilor este variabil. Hifa are lungimi diferite şi nu prezintă septuri intracitoplasmatice (Fig.18 A).

4. Talul este aparatul vegetativ întîlnit la ciupercile superioare. El este format din numeroase hife care se împletesc şi formează un miceliu cunoscut sub numele de tal. Hifele talului pot fi septate complet sau incomplet (Fig.18 B, C) prezentînd împletituri mai mult sau mai puţin compacte. La ciupercile din clasa Basidiomycetes hifele se împletesc compact formînd un tal masiv.

La toate ciupercile la care aparatul vegetativ este un

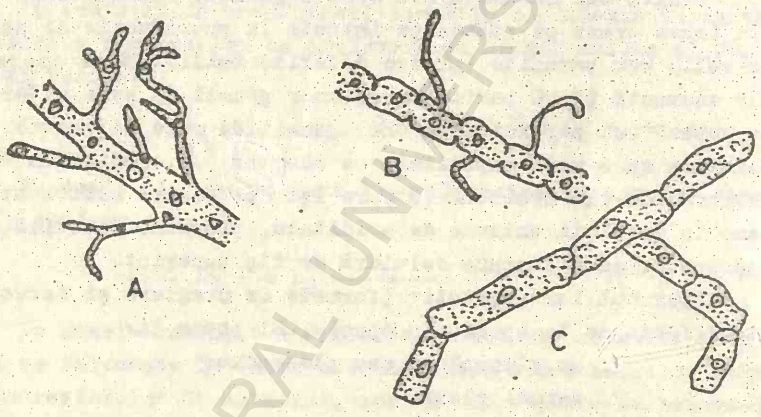


Fig.18. Tipuri de hife întîlnite la ciupercile cu organizare superioară. A-hifă neseptată; B-hifă septată cu pereţi despărţitori incompleţi; C-hifă septată cu pereţii despărţitori completi.

miceliu, se constată în mod obligatoriu sau facultativ diferenţierea acestuia în două părţi:

1. o porţiune formată din hife fine bogat ramificate care pătrund complet în substrat, ele formînd miceliu de substrat. Aceste hife sînt cunoscute sub numele de rizoizi şi formează sistemul rizoidal al miceliului.

2. o porţiune aeriană alcătuită din hife lungi, mai puţin ramificate şi mai rezistente. Ele formează miceliul aerian.

Rizoizii asigură fixarea de substrat a micelului aerian şi absorb apa şi substanţele nutritive, pe cînd miceliul aerian

formează organele de reproducere a ciupercii.

1.Structura internă

Deşi este tipică eucariotelor, există totuşi şi unele deosebiri de la o formă la alta de mucegai. Deosebirile ce pot apare se referă la prezenţa sau absenţa septului sau peretelui hifal.

In general în structura unei hife se pot distinge următoarele formaţiuni structurale tipice celor mai multe eucariote: peretele celular (hifal), membrană plasmatică, citoplasmă şi constituienţii citoplasmatici şi nucleu (Fig.19).

-Peretele hifal. Hifa este delimitată la exterior de un perete rigid în structură căruia intră chitină, celuloză, polizaharide şi unii acizi graşi.

Peretele hifal acoperă membrana plasmatică şi tot el este cel care participă la formarea septului hifal.

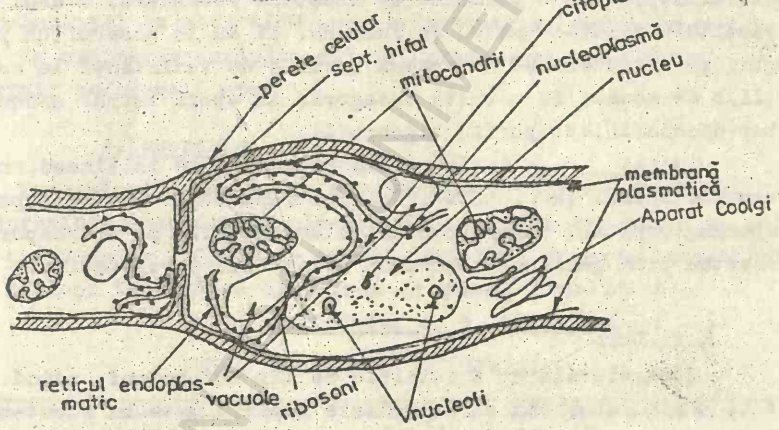


Fig.19. Reprezentarea schematică a structurii interne la mucegaiuri (secţiune printr-un fragment de hifă).

-Membrana plasmatică are o structură tristratificată şi se presupune că ar avea rol important în formarea aparatului Golgi. Are, totodată, importante roluri în transportul unor substanţe din mediu în celulă şi din celulă în mediu.

-Citoplasmă se prezintă sub forma unei mase fin granulate, în care sînt suspendate vacuolele, picături de grăsimi, numeroase granule de incluziuni şi particole. In citoplasmă se găsesc, de asemenea, reticulul endoplasmatic rugos bine dezvoltat, aparatul Golgi, mitocondrii, ribozomi liberi sau fixaţi de reticulul

endoplasmatic şi lizozomi, formaţiuni structural cu rol în liza unor substanţe.

2. Formaţiuni sporale

Ciupercile sînt microorganisme care produc spori ce reprezintă forme de multiplicare a lor sau forme de rezistenţă. Sporii se formează în organe speciale cunoscute sub numele de organe sporogene. Ei pot fi endospori, cînd se formează în interiorul acestor organe sporogene sau exospori, cînd se formează pe organe extrahifale: conidiofori şi bazidiofori.

In raport cu funcţiile pe care le au de îndeplinit sporii pot fi sexuaţi şi asexuaţi.

Sporii sexuaţi se formează prin fuziunea a doi gameţi de dimensiuni egale (izogameţi) sau inegale (heterogameţi) sau prin diviziunea, după o perioadă de creştere secundară, a unei celule rezultate dintr-o astfel de fuziune. Ei au în general un perete gros şi rezistent şi reprezintă formele de rezistenţă la condiţiile de mediu. In această categorie de spori intră: ascosporii, bazidiosporii, zoosporii, zigosporii.

Sporii asexuaţi sînt spori simpli ce se întîlnesc numai la anumite specii de ciuperci. Cei mai răspîndiţi sînt: zoosporii, sporangiosporii, conidiosporii, clamidosporii şi artrosporii. Aceştea prin germinare formează direct forme vegetative.

3. Fiziologie şi metabolism

Mucegaiurile au o nutriţie de tip heterotrof, adică necesită pentru creştere şi dezvoltare medii bogate în substanţe organice.

Sursa de carbon poate fi glucoză sau oricare altă substanţă glucidică, alcoolii şi acizii organici.

Ca sursă de azot fungii pot utiliza compuşii organici de natură proteică, iar unele specii pot utiliza sărurile de amoniu şi nitriţii.

Fungii cresc bine în atmosferă umedă, iar pH lor optim este 5-6. Sînt microorganisme cu capacitate biosintetică mare, putînd sintetiza pe căi metabolice diferite polizaharide, lipide, acizi organici, pigmenţi, substanţe antibiotice sau alte substanţe biologice active.

Temperatura optimă de creştere este de 22-32°C, însă ei pot creşte şi la temperaturi de 5-10°C, dar şi la temperaturi de 35-40°C. Aproape toţi fungii de interes industrial sînt aerobi, necesitînd o concentraţie ridicată de O_2.

Mulţi dintre fungii de interes industrial, necesită pentru creşterea şi dezvoltarea lor bioelemente cum ar fi: Fe, I, K, Zn, Cu, Mn, Mo, Co, etc. Unele specii necesită factori de creştere fără de care procesele metabolice nu pot avea loc în condiţii optime.

Posedînd un echipament enzimatic complex, fungii sînt capabili să descompună cele mai variate substanţe şi să le convertească în propria lor masă celulară.

Prin activităţile lor metabolice şi posibilităţile de a transforma cu uşurinţă o gamă mare de substanţe, mucegaiurile au devenit unii dintre factorii biologici cei mai uzitaţi în industria alimentară şi industria biotehnologică. Ei sînt factorii principali în obţinerea unor brînzeturi de calitate superioară, în obţinerea acidului citric, producerea unor antibiotice, conversia celulozei, etc.

4.Taxonomie

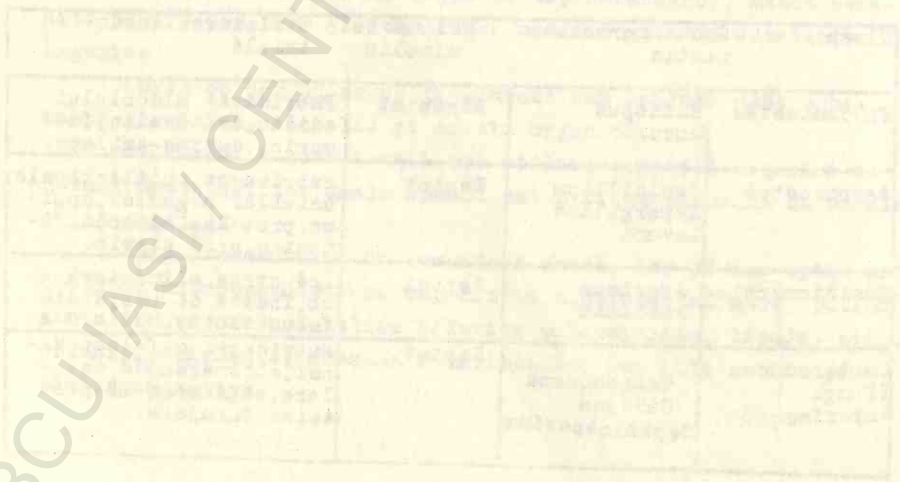
Mucegaiurile fac parte din Phyllum Mycophyta sau Fungi şi reprezintă, împreună cu levurile un grup de organisme incluzînd aproximativ 200.000 de specii.Fungii de interes industrial sînt incluşi în următoarele clase şi genuri (tabelul 4).

Tabelul 4

FUNGI DE INTERES INDUSTRIAL

Clasa	Genul caracteristic	Tipul de miceliu	Utilizarea industrială
Phycomicetes	Rhizopus Mucor	Neseptat	Fabricarea alcoolului etilic,ac. oxalic,fumaric, enzime-amilare.
Ascomycetes	Penicillium Aspergillus Levuri	Septat	Fabricarea antibioticelor, acizilor organici,enzime,proteine,alcooli,vitamine,acid citric.
Basidiomycetes	Agaricus Puccinia	Septat	Industria alimentară obţinerea de preparate îmbunătăţite.
Deuteromyces (Fungi imperfecţi)	Trichoderma Candida Cephalosporium	Septat	Fabricarea cefalosporinei,obţinerea de celulaze,obţinerea de proteine furajere.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



CAPITOLUL III

COMPOZITIA CHIMICA A CELULEI MICROBIENE

In compoziţia chimică a oricărui microorganism intră atît componenţi anorganici (apă şi substanţe minerale) cît şi componenţi organici mai mult sau mai puţin complecşi (glucide, lipide, proteine, nucleoprotsine, vitamine, etc).

Cercetările efectuate pe diferite grupe de microorganisme au arătat că, deşi celula microbiană este de aproximativ 500 ori mai mică ca celula animală, în compoziţia ei s-au descoperit, pînă în prezent, în jur de 6000 de tipuri de molecule diferite. Aproape jumătate dintre acestea sînt reprezentate de molecule "mici", dintre care unele sînt foarte mici cum ar fi H_2O şi CO_2, iar altele pot prezenta grade diferite de complexitate. Unele dintre acestea sînt relativ simple cum ar fi: glucidele, aminoacizii, acizii organici, etc, pe cînd altele formează macromolecule cu înalt grad de complexitate, ca de exemplu: glicoliproteinele, fosfolipoproteinele, acizii nucleici, etc.

1. Componenţi anorganici celulari

1.1. Apa

Apa reprezintă componentul cel mai important şi cel mai simplu al celulei microbiene. In celula vie ea se găseşte în proporţie de 75-85% din greutatea umedă a acesteia.

Conţinutul de apă a celulei microbiene poate fi dedus din diferenţa dintre greutatea umedă a celulei şi greutatea ei după uscarea la 105°C.

Apa în celula microbiană se găseşte atît în stare liberă cît şi legată de diferiţi compuşi organici.

In celulă apa îndeplineşte o serie de funcţii indispensabile supravieţuirii. Principalele sale funcţii sînt:

a) apa este mediul de solvire a constituienţilor hidrosolubili şi mediul de dispersie a constituienţilor insolubili;

b) apa, mediază desfăşurarea reacţiilor enzimatice şi metabolice celulare;

c)apa asigură transportul diferitor metaboliţi în,şi din celulă;

d)apa este mediul de reacţie a metabolitilor intermediari;

1.2. Substanţe minerale

Substanţele minerale reprezintă 2-30% din greutatea uscată a celulei. Ele intră în compoziţia unor compuşi organici sau anorganici. Elementele chimice des întîlnite în structura acestor substanţe sînt: K, P, Ca, S, Cl,,Co, Cu, Fe, W, Mg, Zn, etc.

Cel mai bine reprezentat în celula microbiană este fosforul, el reprezintă aproximativ 45% din întreaga cantitate de săruri minerale celulare.

In celula microbiană substanţele minerale se găsesc fie sub formă de electroliţi fie sub formă de complexe coloidale (agregate de molecule suspendate într-un mediu apos). Se presupune că electroliţii din celula microbiană s-ar găsi legaţi de proteinele citoplasmatici, sau în stare liberă. Cantitatea de electroliţi în stare liberă este în raport cu volumul apei intracelulare nelegate, volum care la rîndul ei variază în funcţie de starea tabolică a celulei.

Substanţele minerale îndeplinesc mai multe roluri în celula microbiană printre care amintim:

a)influenţează permiabilitatea peretelui celular, favorizînd schimburile dintre celulă şi mediu;

b)contribuie la reglarea presiunii osmotice şi la menţinerea echilibrului de membrană;

c)intră în structura multor constituienţi celulari, în caz care joacă rol plastic, precum şi în structura unor enzime şi substanţe macroenergice;

d)activează unele sisteme enzimatice (Cu,Mg,Zn);

e)contribuie la reglarea pH şi rH celular.

2. Componenţi organici celulari

Componenţii organici prezenţi în celula microbiană au o structură mai mult sau mai puţin complexă; ei putîndu-se găsi la un moment dat sub formă simplă, dar de cele mai multe ori formează complexe cu structură complicată.

In categoria componenţilor organici celulari intră: proteinele, lipidele, glucidele, acizii nucleici, enzimele, vitaminele, etc.

2.11 Proteinele

Proteinele reprezintă în medie 60% din greutatea uscată a celulei şi sînt reprezentate de circa 2-3000 de tipuri diferite. Ele pot fi proteine simple sau complexe. Proteinele simple sînt reprezentate prin structuri moleculare tipice, în a căror compoziţie intră aminoacizii, pe cînd proteinele complexe conţin în molecula lor şi componente neproteice. Acestea sînt cunoscute sub numele de heteroproteine şi în categoria lor intră: glicoproteinele, fosfolipoproteinele, etc.

In raport cu rolul pe care îl joacă în celulă proteinele se pot grupa în: proteine plastice şi proteine enzime. Proteinele plastice reprezintă aproximativ 50% din totalul de proteine celulare, ele participînd la structurarea celulei, pe cînd protein enzimele reprezintă cealaltă jumătate şi au roluri catalitice.

2.2. Lipidele

Lipidele sînt substanţe organice insolubile, reprezentînd aproximativ 1-20% din greutatea uscată a celulei. Lipidele reprezintă unul dintre componenţii majori ai membranei plasmatice. Ele se găsesc răspîndite şi în citoplasmă, sub formă de granule intracioplasmatice sau intră în componenţa unor structuri ale acesteia.

Lipidele citoplasmatice reprezintă un important rezervor de atomi de carbon, fiind substanţe cu un înalt grad energetic. Acumularea lipidelor în celulă este un semn de îmbătrînire care va conduce în final la degenerarea sa.

Lipidele în celulă se pot găsi sub formă de glicerol, fosfatide sau ceruri.

Rolul lor în celulă este cel de substanţă de rezervă sau de sursă în procesele de biosinteză.

2.3. Glucidele

Glucidele sînt substanţe energetice şi plastice de importanţă vitală pentru celulă. Ele reprezintă aproximativ 4-25% din greutatea uscată a celulei. Din punct de vedere structural ele pot fi glucide simple (mono şi dizaharide), glucide complexe (pentozani, hexozani) sau polimeri micşti (glicoproteine, lipoproteine).

Glucidele complexe formează marea grupă a polizaharidelor,

care pot fi găsite atît intracelular, ca substanţe de rezervă, cît şi extracelular cînd intră în structura capsulei sau glicocalixului.

Unele bacterii pot acumula cantităţi mari de polizaharide în celulă şi în jurul ei, în special cînd creşterea a fost oprită prin epuizarea sursei de azot.

Glucidele au roluri diferite în celulă. Cele cu structură simplă iau parte la metabolismul intermediar, în timp ce polizaharidele au, după caz, rol plastic, energetic sau de substanţe de rezervă.

2.4. Acizii nucleici

In celula microbiană se găsesc două tipuri de acizi nucleici: acidul dezoxiribonucleic (ADN) şi acidul ribonucleic (ARN).

-ADN în celula microbiană se poate găsi sub forma unei molecula unice dubluhelicale ca la bacterii sau sub forma unor structuri mai complexe în care intră şi unele proteine formînd formaţiuni cromozomale ca la levuri şi fungi. ADN reprezintă aproximativ 1/5 din conţinutul celular. La bacterii ADN formează un cromozom unic filamentos şi linear, pe cînd la ciuperci el este reprezentat prin 2-4 cromozomi.

In structura ADN intră o substanţă de natură glucidică, o bază azotată (purină sau pirimidină) şi acid fosforic.

Conţinutul în baze purinice/pirimidinice variază de la specie la specie şi el este unul dintre criteriile taxonomice. De exemplu, la bacterii conţinutul de G + C este de 30-75%, pe cînd cel de A+T este de 25-70%. Raportul A+T/G+C este caracteristic fiecărei specii bacterieme şi are valoare taxonomică.

Rolul ADN-lui în celulă este cel genetic. La nivelul său se înmagazinează întreaga informaţie genetică celulară.

-ARN reprezintă aproximativ 10-20% din greutatea uscată a celulei. Se găseşte în citoplasmă sub trei forme diferite: ARN_m; ARN_t; ARN_r.

a) ARN_m, este ARN mesager sau de mesaj, el reprezintă aproximativ 1% din ARN-ul total celular. Se cunosc aproximativ 1000 tipuri diferite de ARN_m. El are rolul în celulă de a transporta de la genele ADN la ribozomi informaţi (mesajul) necesar sintezei proteice. La bacterii ARN_m este o moleculă cu viaţă scurtă, el este distrus enzimatic la 1-2 min. de la sinteza sa.

Datorită acestui fapt, celula bacteriană sintetizează aproximativ 12.500-25.000 de molecule de ARN_m pe parcursul unei generaţii.

b)ARN_t, transportor sau solubil, are rolul de a transporta şi aranja fixarea aminoacizilor în matricea de ARN_m. Se prezintă sub 1-4 tipuri diferite ce corespund celor 20 aminoacizi naturali.

c)ARN_r, ribozomal, prezenţa sa este semnalată în structura ribozomilor, dar funcţiile sale sînt încă necunoscute.

2.5. Enzimele microbiene

Microorganismele posedă echipamente enzimatice foarte complexe şi active, datorită cărora ele îşi pot desfăşura în bune condiţii procesele fiziologice şi metabolice celulare. Enzimele microbiene ca biocatalizatori ai reacţiilor ce implică formarea sau desfacerea unei legături, prezintă o serie de caracteristici ce nu le deosebesc cu nimic de enzimele plantelor sau animalelor. Toate enzimele, indiferent de originea lor, prezintă următoarele caractere generale:

- -sînt eficiente în cantităţi foarte mici;
- -se găsesc neschimbate la sfîrşitul reacţiei;
- -nu afectează echilibrul reacţiei chimice;
- -au o mare specifitate pentru substrat.

Din punct de vedere chimic enzimele microbiene sînt fie proteine simple sau holoproteine, fie proteine conjugate sau heteroproteine. Enzimele heteroproteice sînt formate din două componente:

a)apoenzima care reprezintă componenta proteică, ea determinînd specificitatea reacţiei enzimatice şi;

b)coenzima cea de a doua componentă. Ea poate fi un compus organic sau anorganic şi are rolul de a activa substratul asupra căruia va acţiona apoenzima.

Cele două componente sînt inactive cînd sînt separate, dar punerea lor în contact duce la activare şi la manifestarea activităţii lor catalitice.

Atît enzimele holoproteice cît şi cele heteroproteice posedă o anumită porţiune din structura lor care este cunoscută sub denumirea de centrul activ enzimatic. Aici aminoacizii componenţi sînt dispuşi într-o anumită ordine secvenţială specifică fiecărei enzime. Această porţiune - centrul activ enzimatic este responsabil de activitatea catalitică. Unele enzime pre-

zintă în centrul lor activ metale (Cu, Mg, Zn, etc) acestea formează grupa așa numitelor metalenzime.

In orice reacție enzimatică sînt implicați doi factori : substratul (S) și enzima (E). Ca urmare a reacției ce poate avea loc între cei doi factori se formează un complex ES în care enzima fixată pe substrat prin centrul ei activ îl hidrolizează după următoarea reacție:

$$S + E \rightleftharpoons SE \rightleftharpoons E + A + B + C + \ldots$$

unde: S = substratul de hidroliză; E = enzima; A, B, C... = produși de hidroliză.

Reacția enzimatică este reversibilă, ea fiind mult influențată de o serie de factori (temperatură, pH, substrat, etc), precum și de prezența sau absența inhibitorilor.

In funcție de raportul lor cu celula producătoare, enzimele microbiene se împart în două grupe mari:

a)enzime extracelulare sau exoenzime aceste enzime sînt eliminate de către microorganismul producător în mediul de cultură. In categoria lor intră în special enzimele hidrolitice. Din punct de vedere industrial acestea sînt cele mai interesante, deoarece nu complică procesul tehnologic cu proceduri de extracție speciale.

b)enzime intracelulare sau endoenzimale, sînt considerate acele enzime care nu sînt eliminate din celulă după producerea lor. Aceste enzime la rîndul lor se împart și ele în două categorii:

-enzime solubile, care sînt localizate la nivelul structurilor de suprafață a celulei. Ele nu pot fi puse în libertate decît prin acțiunea unor factori mecanici sau fizici asupra celulei microbiene;

-enzime de constituție sau particulate, reprezintă acele enzime ce sînt legate de anumite structuri celulare (membrană sau unii constituienți citoplasmatici) și participă la realizarea proceselor metabolice energetice și de structurare celulară.

Cele mai multe dintre enzimele microbiene sînt sintetizate de celulă numai atunci cînd în mediul de cultură există substratul de acțiune. Aceste enzime au fost denumite enzime induse sau catabolice. Substratul care induce biosinteza lor poate fi o substanță plastică, energetică sau chiar o substanță nocivă (penicilina).

Alte enzime sînt sintetizate în celulă indiferent de prezenţa sau absenţa substratului inductor, acestea sînt enzime de constituţie sau anabolice şi participă la desfăşurarea reacţiilor de biosinteză celulară.

2.6. Vitaminele

Prezenţa vitaminelor a fost semnalată la multe microorganisme de interes industrial (bacterii, levuri şi fungi).

Unele bacterii (Propionibacterium shermanii), precum şi unele levuri (Hansenula) produc cantităţi apreciabile de vitamine, în special din grupa B(B_{12}, B_2, B_6). Vitamina B_{12} se produce în prezent pe cale industrială.

Unele microorganisme intestinale (E.coli, Lactobacillus, etc) sintetizează importante cantităţi de vitamină K, iar unele specii aparţinînd tot florii intestinale sintetizează vitamina B_6.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C A P I T O L U L IV

MULTIPLICAREA MICROORGANISMELOR

Multiplicarea este procesul prin care microorganismele îşi măresc numărul de indivizi.

Cele mai multe dintre microorganisme sînt unicelulare; corpul lor fiind format dintr-o singură celulă(clonă), care prin procese biologice de multiplicare, va da naştere la noi celule identice din punct de vedere genetic.

1.Multiplicarea la bacterii

Multiplicarea bacteriilor se realizează pe două căi:

a)diviziune;
b)înmugurire sau ramificare.

a)Multiplicarea prin diviziune are loc prin simpla scindare sau divizare a celulei bacteriene în două celule , Fiind o scindare a celulei mame ea este cunoscută şi sub denumirea sciziparitate. Acest fenomen ar consta în scindarea celulei clonale în două celule egale sau inegale care la rîndul lor pot fi supuse la noi procese de scindare.

Scindarea celulei clonale sau a celulei mame într-o populaţie microbiană se face în două moduri (Fig.20 a şi b):

-prin strangulare;
-prin formarea unui sept transversal de diviziune.

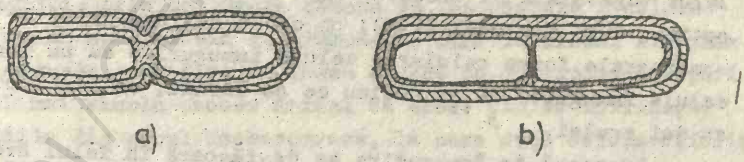


Fig.20.Reprezentarea schematică a procesului de multiplicare a bacteriilor. a)prin strangulare b)prin formarea de sept transversal.

Scindarea sau diviziunea celulei bacteriene este întotdeauna precedată de replicarea cromozomului bacterian.

b)Multiplicarea prin înmugurire sau ramificare este acel proces multipicațional prin care pe suprafața unei celule se formează un mugure terminal sau lateral (Fig.21, a și b), care prin creștere va deveni o nouă celulă ce rămîne legată de celula mamă.Legătura dintre celula mamă și mugure se face prin intermediul unui tub de legătură la nivelul căruia apare un sept transversal ce desparte cele două celule.

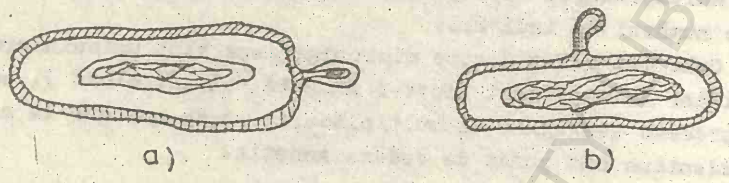


Fig.21. Reprezentarea schematică a multiplicării bacteriilor prin înmugurire. a)înmugurire terminală; b)înmugurire laterală.

Cînd celulele rezultate din multiplicare rămîn atașate de celula mamă, ele formează false ramificații, de unde vine și denumirea de multiplicare prin ramificare.

2. Multiplicarea la levuri

Creșterea numărului de indivizi la levuri se poate realiza pe două căi:

a) asexuat (fără participarea de sexe);
b) sexuat (cu participarea a două sexe diferite)

a)Multiplicarea pe cale asexuată se realizează în două moduri: prin înmugurire sau diviziune directă.

-Inmugurirea este principala cale de multiplicare a celulelor vegetative de drojdii, cînd condițiile de creștere sînt optime. După Hertwell (1973) un ciclu de înmugurire ar cuprinde următoarele forme celulare: celule înmugurite cu un nucleu, celule înmugnite cu un nucleu ce se divide, celule înmugurite cu doi nuclei.

Procesul de înmugurire se desfășoară în felul următor: reticulul endoplasmatic emite un semnal chimic care determină o evaginare locală a peretelui celular în care este antrenată masa protoplasmatică subiacentă. Proeminența formată crește pînă atinge aproape dimensiunea celulei mame, după care se produce diviziunea nucleului,iar între celule apare un perete despărțitor (Fig.22).

Uneori, noua celulă rezultată prin înmugurire rămîne atașată de celula mamă și continuă la rîndul său înmugurirea,

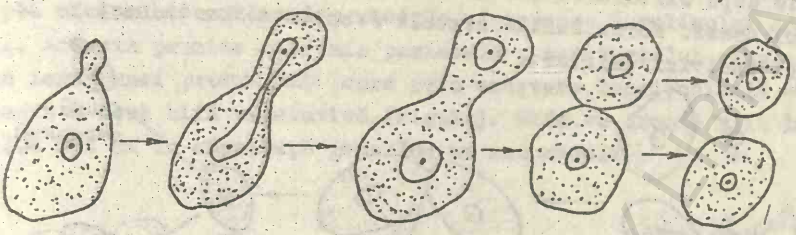


Fig.22. Etapele unui ciclu de înmugurire la levuri (după Hartwell, 1973)

ducînd în modul acesta la formarea de colonii (Candida).

-Diviziunea directă. Această formă de multiplicare este caracteristică genului Schizosaccharomyces, fapt pentru care este cunoscută și sub denumirea de multiplicare prin scizipariate.

Procesul de diviziune directă a levurilor constă într-o alungire a celulei parietale, urmată de divizarea și migrarea nucleilor formați prin divizarea nucleului parietal către extremitățile celulei, după care are loc separarea celor două celule fice, prin formarea unui sept de diviziune. Celulele formate se pot separa între ele sau pot rămîne alipite una de alta formînd un pseudomiceliu (Candida).

b)Multiplicarea pe cale sexuată. Această formă de multiplicare celulară este proprie levurilor sporogene (care formează spori). Fenomenele sexuale la levuri se realizează prin procese de conjugare. In acest sens două celule diferite joacă rol de gameți, prin conjugare cărora va lua naștere o celulă sexuală cu un număr dublu de cromozomi, care la rîndul ei, prin procese sexuale specifice va forma organe de multiplicare:spori

Cel mai simplu proces sexual de acest tip se întîlnește la drojdiile din genul Saccharomyces, la care două celule diferite ce s-au diferențiat în gameți se apropie, la locul de contact peretele celular se dezagregă (probabil enzimatic) determinînd trecerea conținutului unei celule în conținutul celeilalte și formarea unei celule mai mare ca dimensiuni. Această celulă nou formată reprezintă un zigot ce se poate multiplica în continuare prin înmugurire sau se poate transforma într-o formațiune specială - ască (Fig.23).

Asca este o formaţiune biologică sporală în interiorul căreia se formează 4 ascospori apţi la rîndul lor de conjugare, fie după eliberarea lor în mediu extern, fie chiar în interiorul ascei. Formaţiunile sexuale rezultate vor da naştere la noi indivizi celulari.

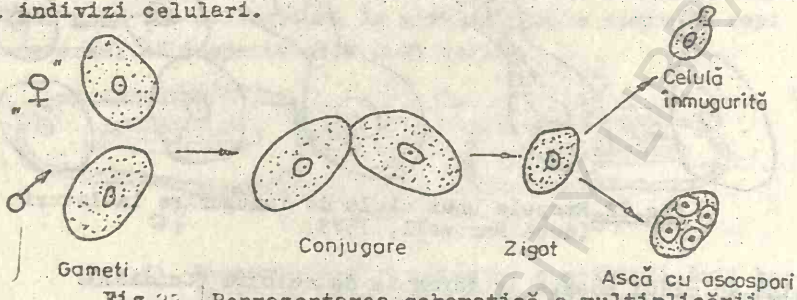


Fig.23. Reprezentarea schematică a multiplicării pe cale sexuată.

Există levuri care formează un tip diferit de formaţiuni sexuale cunoscute sub denumirea de bazidii ce conţin în interiorul lor bazidiospori. Ele se formează după un proces asemănător celui de formare a ascelor cu ascospori. Eliberarea bazidiosporilor se face exploziv, din ei formîndu-se noi indivizi, prin germinare.

La unele specii de levuri se întîlnesc formaţiuni sexuale mixte: clamidospori,ce provin fie din ascospori,fie din basidospori, la care se formează un perete celular gros şi rigid, iar în interior se acumulează substanţe de rezervă.Clamidosporii se formează în special în culturile învechite.

Cînd sporii ajung în condiţii favorabile vor germina dînd naştere la noi indivizi.

3.Multiplicarea fungilor

Fiind microorganisme cu o structură ceva mai complexă, fungi şi-au perfecţionat şi căile de multiplicare, ce le face să reziste la cele mai variate condiţii de mediu.

Multiplicarea lor se face prin spori care sînt şi organe de rezistenţă la condiţiile nefavorabile de mediu.

Sporii fungilor sînt de două feluri:

a)spori asexuaţi ce iau naştere din celula vegetativă, şi nu implică intervenţia a două sexe diferite;

b)spori sexuaţi rezultaţi direct sau indirect din încrucişarea a două hife de sexe diferite.

Sporii fie că sînt sexuaţi, fie că sînt asexuaţi, în condiţii favorabile de mediu germinează. Fenomenul constă în umflarea sporului, uneori pînă la 8 ori volumul iniţial, urmată de apariţia unei mici umflături parietale şi ruperea învelişului sporal. Aceasta permite extruzia parietală a conţinutului celular sub forma unei protuberanţe care prin creştere longitudinală va genera o nouă hifă vegetativă (Fig.24). Hifa va creşte atît în volum cît şi în suprafaţă generînd un nou micel.

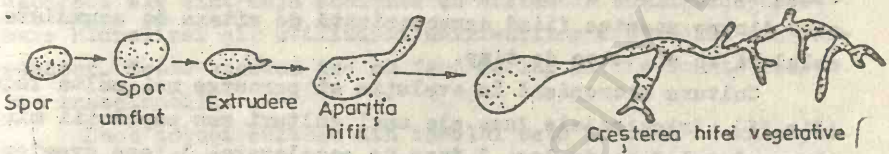


Fig.24. Etapele de germinare a sporului fungal.

Miceliul nou format se va structura în raport cu specia de la care provin sporii.

CRESTEREA MICROORGANISMELOR

Prin creştere se înţelege mărirea coordonată a tuturor componenţilor unei celule microbiene ca rezultat a adăugării de substanţă nouă. Acest proces este rezultatul sintezei specifice, echilibrate a unor noi compuşi ce sînt ansamblaţi în noile celule după mecanisme genetice foarte complecate.

Creşterea celulelor microbiene se realizează prin depunerea uni sau tridimensională de substanţă nouă, ceea ce determină mărirea celulei în sensul uneia dintre dimensiuni sau în sensul tuturor dimensiunilor ei. Deci, celula microbiană va creşte atît în suprafaţă cît şi în volum.

Creşterea microorganismelor nu se face la infinit, ea se întrerupe la un moment dat, cînd intervine multiplicarea ce conduce la creşterea numărului de indivizi. Se consideră că multiplicarea intervine atunci cînd se modifică raportul dintre suprafaţă şi volum. In timpul creşterii, acest raport se modifică, deoarece suprafaţa creşte la pătrat pe cînd volumul creşte la cub, ceea ce are drept consecinţă diminuarea suprafeţei celulei faţă de volum. Cînd disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un nivel critic, raportul se restabileşte prin intervenţia procesului de multiplicare.

1. Viteza de creştere a microorganismelor sau evoluţia unei culturi microbiene.

Microorganismele, indiferent de forma lor de cultivare, cresc şi se dezvoltă în colonii, formînd deci populaţii microbiene. De aceea, aspectele privind viteza de creştere a lor se referă la întreaga populaţie şi nu la indivizi luaţi izolat.

Orice populaţie sau cultură microbiană (cu referire specială la bacterii şi levuri), evoluiază în mai multe faze, fiecare dintre acestea fiind caracterizată de viteza de acumulare celulară în unitatea de timp.

Cultura microbiană în evoluţia ei parcurge mai multe faze (Fig.25). Principalele faze ale unei culturi sau populaţii microbiene sînt: 1. faza de lag; 2. faza de accelerare; 3. faza creşterii exponenţială; 4. faza de decelerare; 5. faza staţionară; 6. faza de declin.

1. Faza de lag, cunoscută şi sub numele de faza de latenţă sau de creştere zero, este faza în care nu se constată modificări esenţiale; cultura microbiană fiind în această fază supusă unor procese de adaptare la noile condiţii de cultivare. Această fază începe în momentul introducerii inoculului în bioreactor şi durează pînă în momentul începerii multiplicării. Pe parcursul ei numărul de microorganisme rămîne relativ constant, sau se pot înregistra unele scăderi cauzate probabil neadaptabilităţii unor celule la noile condiţii.

Durata acestei faze este dependentă de vîrsta inoculului.

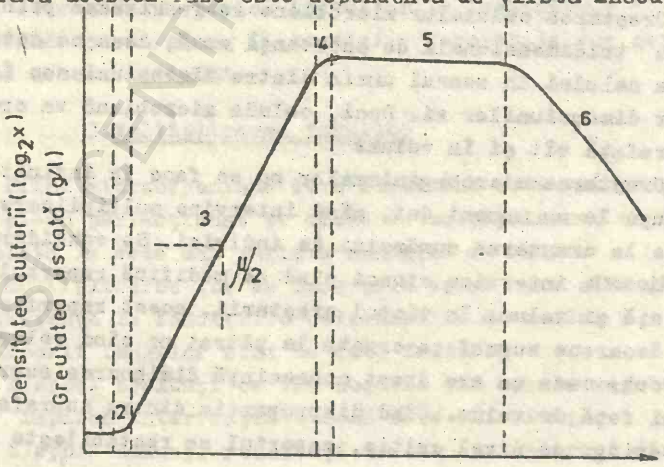


Fig.25. Curba tipică ce redă evoluţia unei culturi microbiene. 1. faza de lag; 2. faza de accelerare; 3. faza creşterii exponenţiale; 4. faza de decelerare; 5. faza staţionară 6. faza de declin.

Dacă celulele ce urmează să fie inoculate provin dintr-o cultură veche, deci sînt celule deficitare în sistemele enzimatice nutriţionale şi constituţionale, durata de adaptare este mai mare. Această durată prelungită se datorează necesităţilor de refacere şi adaptare a sistemelor enzimatice la noile condiţii de mediu.

Dacă inoclul este format din celule în faza de multiplicare activă, trecerea lor în noile condiţii de cultivare din bioreactor nu va mai necesita o perioadă de adaptarea îndelungată, deoarece ele sînt deja echipate cu sistemele enzimatice necesare hidrolizei şi utilizării nutrienţilor din mediul din bioreactor. Toate acestea fac ca faza de lag să fie foarte scurtă sau insesizabilă.

Dacă totuşi cultura din inoclul este în faza de multiplicare, dar mediul de inocul este diferit de cel din bioreactor, atunci faza de lag va fi mai lungă, microorganismul urmînd să se adapteze noilor condiţii de mediu şi să-şi formeze sistemele enzimatice specifice acestor condiţii.

2.Faza de accelerare urmează imediat după faza de lag şi este considerată o fază intermediară între aceasta şi faza creşterii exponenţiale. Acum se constată o accelerare a proceselor metabolice, ce probabil conduc la creşteri semnificative a celulelor, şi în raport cu acestea şi la accelerarea proceselor de multiplicare. In această fază raportul dintre celulele tinere şi cele din inocul este de 1/2.

3.Faza creşterii exponenţiale sau faza logaritmică, este faza în care are loc creşterea şi multiplicarea activă a celulelor din cultură. Viteza de creştere a numărului de celule din cultură nu este însă constantă pe tot parcursul ei. La începuturile ei creşterea se accelerează progresiv, astfel că, la un moment dat atinge o valoare maximă, acum valoarea ratei de creştere $\mu = \mu_{max}$, după care se constată din nou o creştere ceva mai latentă, urmată de scăderea valorică a ratei de creştere. Cînd cultura atinge valoarea maximă a ratei de creştere (μ_{max}) cultura se află în echilibru aproape perfect, creşterea fiind constantă. Dacă în sistemul de cultivare, în acest moment nu se intervine cu nutrienţi, apare tendinţa de scădere a vitezei de creştere a culturii şi deci procesele de multiplicare diminuiază.

In finalul acestei faze se constată o stagnare a multi-

pliezării celulelor, cele mai multe dintre ele prezentînd forme bătrîne, acumularea metaboliţilor şi substanţelor toxice creştere, iar cultura va intra într-o nouă fază.

4.Faza de decelerare corespunde modificărilor ratei de creştere, scăderii progresive a ei ce face ca la un moment dat ea să se apropie de zero, creşterea oprindu-se.

5.Faza staţionară. In această fază numărul celulelor viabile este maxim şi rămîne constant o perioadă de timp, care poate dura de la cîteva ore la cîteva zile. Fenomenele de creştere şi multiplicare devin din ce în ce mai limitate, ce face ca numărul de celule moarte să fie egal cu cele vii, iar cultura să nu înregistreze modificări calitative. Astfel, acum apar o serie de modificări în lichidul de cultură, sursele nutritive sînt deficitare, sau lipsesc, apariţia de produşi de metabolism creşte şi o dată cu ei şi toxicitatea lor asupra celulelor viabile. Acestea la rîndul lor se modifică morfologic şi structural ca urmare a îmbătrînirii celulelor.Dimensiunile culturii sînt mai mici ca în fazele anterioare, citoplasma este mai puţin omogenă, iar acumularea de substanţe toxice creşte.

6.Faza de declin corespunde unei scăderi progresive de celule viabile, mergîndu-se pînă la sterilizarea culturii. Unele celule viabile mai supravieţuiesc pe seama substanţelor rezultate din liza celulelor moarte. Tot acum se constată, la celulele care mai supravieţuiesc, un accentuat polimorfism. Substanţele nutritive din mediu ajung şi ele în faza finală de epuizare, diminuiază tensiunea superficială a oxigenului scăzînd totodată concentraţia compuşilor folosiţi în procesele respiratorii. Toate aceste conduc în final la moartea culturii şi sterilizarea sa.

Fungii, spre deosebire de bacterii şi levuri prezintă o serie de particularităţi în ceea ce priveşte viteza lor de creştere. In cazul lor se disting trei faze distincte: 1. faza de lag; 2. faza de creştere; 3. faza de învechire.

-<u>In faza de lag</u> are loc germinarea sporului sau regenerarea hifelor care au servit ca inocul. Durata acestei faze este de cîteva ore, în care fenomenele de creştere şi multiplicare sînt absente.

-<u>Faza de creştere</u> este marcată prin apariţia la suprafaţa mediului a unei colonii circulare care va creşte liniar în raport cu timpul. Viteza de creştere nu este aceiaşi însă în întreaga colonie. Ea este constantă la marginea coloniei şi mult mai lentă în centrul coloniei. In această fază nu s-a putut stabili

o corelaţie între creşterea coloniei în suprafaţă şi creşterea ei în greutate. In mediile sărace în nutrienţi coloniile cresc mult în suprafaţă dar mai puţin în greutate. In mediile nutritive bogate în nutrienţi, creşterea în suprafaţă este mai lentă, în schimb creşterea în greutate este apreciabilă, miceliul fiind foarte gros.

-Faza de învechire se caracterizează prin încetinirea ritmului de creştere. Această fază este însoţită la unele specii de liza miceliului în centrul coloniei. Pe mediile bogate în substanţe nutritive, faza de învechire este mai precoce, deoarece produşii de metabolism se acumulează mai rapid, devenind toxici.

Pe mediile lichide, la suprafaţa lichidului de cultură se formează o pînză micelianǎ care va creşte în mod diferit dat fiind faptul că diferitele sale părţi miceliene sînt în condiţii de anaerobioză diferite. In cazul culturilor industriale trebuie să se ţină cont de această particularitate astfel încît micelul să fie expus în mod uniform aerării.

2.Indicatori ai creşterii microorganismelor.

2.1.Rata de creştere

Rata de creştere (μ) reprezintă numărul de generaţii (n) în unitatea de timp (t).

Deci:

$$\mu = \frac{n}{t}$$

Intrucît rata de creştere, după Monod exprimă activitatea sintetică a celulelor microbiene, se poate considera că ea corespunde vitezei de creştere. Rata de creştere sporeşte progresiv pe toată perioada multiplicării pînă cînd atinge o valoare a sa maximă ce caracterizează starea creşterii constante a culturii microbiene.

Monod în urma unor cercetări laborioase stabilea , încă din anul 1942, următoarea relaţie matematică ce defineşte rata de creştere, în raport cu concentraţia substratului limitator (S).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

unde: S = concentraţia substratului limitator;

K_s = constanta de saturaţi a substratului

μ_{max} = rata maximă de creştere;

μ = rata de creştere.

Dacă S şi μ_{max} sînt variabile uşor de determinat, K_s se determină experimental la valori ale lui μ păstrate la $\mu_{max}/2$. La aceste valori concentraţia substratului este egală cu K_s. Lineweaver şi Burk fac astfel de determinări la $1/\mu$ în raport cu 1/S. In urma acestor experimentări autorii obţin o relaţie asemănătoare celei a lui Monod, formula ei fiind identică cu ecuaţia clasică a dinamicii enzimatice a lui Michaelis-Menten.

In sisteme de cultivare continuă rata de creştere nu trebuie să depăşească valoarea ratei maxime de creştere (μ_{max}), aceasta deoarece este posibil să apară o epuizare rapidă a nutrientului sau nutrienţilor din lichidul de cultură, care ar atrage după sine modificarea ratei de diluţie şi pierderea de sub control a procesului.

Cînd cultura se dezvoltă la rate de creştere constante, rata de creştere are valoare maximă, iar cultura este într-o stare specială - starea creşterii constante. Această stare este momentul în care trebuie să se realizeze o cultură continuă. Pe parcursul ei, între rata de creştere şi rata de diluţie (rata cu care se adaugă nutrienţii în bioreactor) se stabileşte un echilibru aproape perfect, ce face ca cultura să evolueze constant.

2.2. Numărul de generaţii

Numărul de generaţii reprezintă intervalul de timp în care numărul de indivizi dintr-o cultură se dublează. Se notează prescurtat cu "n".

De exemplu, dacă într-un bioreactor a fost inoculate X_o celule (g/l), după o diviziune cantitatea lor va creşte la X_1 $X_1 = 2 X_o^o$, acestea îşi continuă diviziunea pînă la valori n.

$$\text{Deci: } X_o \longrightarrow 2 X_o \longrightarrow 4 X_o \longrightarrow n X_o \longrightarrow X_n$$

Generalizînd atunci:

$$X_n = 2^n X_o$$

Logaritmînd se obţine relaţia:

$$n = \log_2 \frac{X_n}{X_o} \quad \text{sau} \quad n = \log_2 X_n - \log_2 X_o$$

Folosind relaţia de mai sus se poate determina numărul de generaţii la un moment dat în cultura din bioreactor, valori matematice ce la rîndul lor se pot folosi la determinarea altor indici ai creşterii.

2.3. Timpul de generaţii

Timpul de generaţii este cunoscut şi sub denumirea de timpul de dublare a masei celulare. El se defineşte ca timpul necesar dublării masei celulare a populaţiei microbiene faţă de momentul zero.

Se notează prescurtat cu T_d şi se poate calcula după următoarea relaţie matematică:

$$T_d = \frac{t}{n}$$

Se exprimă în ore sau minute.

De exemplu, dacă iniţial s-au inoculat 5 g celule, deci X_o= 5g, iar într-un interval de timp de 12 ore, au rezultat 7 generaţii, deci n = 7, atunci

$$T_d = \frac{12}{7} = 1{,}71 \text{ h}$$

Putem spune că pentru dublarea celor 5 g de celule sînt necesare 1,71 h.

Dacă se doreşte să se calculeze cantitatea de celule la un moment dat, deci X_t, atunci ştiind densitatea celulară iniţială (X_o) şi timpul la care urmează să se facă calculul (determinarea), valoarea lui X_t se obţine cu formula:

$$X_t = X_o \cdot 2^n = X_o \cdot 2^{t/T_d}$$

Rearanjînd şi logaritmînd relaţia devine:

$$\ln (X_t \cdot X_o) = \ln 2 \frac{t}{T_d}$$

BCU IASI - CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL V

FIZIOLOGIA MICROORGANISMELOR DE INTERES INDUSTRIAL SI PROCESELE LOR METABOLICE

1. Necesităti nutritive

Microorganismele în general, şi în special cele de interes industrial, au nevoie pentru creştere şi multiplicare, precum şi pentru producerea unor substanţe biologic active, de prezenţa în mediul de cultură a celor mai adecvate substanţe nutritive, care să conţină, pe de o parte elementele chimice necesare sintezei propriilor constituienţi celulari, a unor enzime specifice şi metabolice, a sistemelor de transport celular, iar pe de altă parte, să furnizeze substanţele necesare producerii de energie pentru procesele celulare proprii cît şi pentru procesele biosintetice de produşi biologici. Deci, fiecare microorganism folosit într-un anumit proces industrial necesită un mediu de cultură a cărui compoziţie să-i ofere elementele necesare proceselor biosintetice. Orice mediu de cultură trebuie să cuprindă în compoziţia sa bioelementele de sinteză celulară şi substanţele nutritive specifice procesului.

1.1. Biolelementele

Microorganismele au nevoie pentru creştere de acele elemente ce constituie structura oricărui sistem biologic. Dintre elementele necesitate de microorganisme unele sînt deosebit de importante şi formează categoria bioelementelor majore, iar altele sînt necesare în cantităţi extrem de mici şi sînt grupate în categoria bioelementelor minore.

-Bioelementele majore sînt reprezentate prin C, H, O, N, S, P, K, Mg, Ca, Fe, Dintre acestea C, O, H, N, S şi P formează aproximativ 95% din greutatea uscată, ele reprezentînd constituienţii principali ce trebuie incluşi prin componenţii surselor nutritive în compoziţia mediilor. Unele dintre aceste

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

elemente (C, H, O şi N) sînt implicate în toate structurile şi sintezele celulare, compuşii lor fiind cei ce furnizează energia necesară desfăşurării proceselor metabolice, pe cînd unele (S şi P) sînt implicate numai în anumite procese celulare. De exemplu, S este necesar pentru sinteza unor aminoacizi a unor coenzime, în timp ce P intră în structura acizilor nucleici, fosfolipidelor, precum şi a unor substanţe macroenergice (ATP, GTP, NAD, etc).

Celelalte elemente sînt ioni necesari unor activităţi enzimatice sau intră ca elemente chimice în structura unor substanţe celulare.

-Bioelementele minore sînt reprezentate prin elementele: Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Co, Cu, W sau chiar Ni. Toate aceste elemente sînt necesare în cantităţi foarte mici. Unele, cum ar fi de exemplu, Zn şi Mn sînt necesare ca elemente esenţiale pentru toate microorganismele, în timp ce altele, cum ar fi: Mo, Co, Cu, W sînt necesare numai pentru activităţi metabolice speciale, de exemplu, pentru sinteza unor enzime (nitratreductaza, formiatdehidrogenaza), precum şi pentru desfăşurarea unor procese industriale de biosinteză, ca elemente de structură a unor molecule biologic active (Co, pentru sinteza vitaminei B_{12}, Cu, pentru sinteza şi activitatea unor enzime respiratorii: citocromoxidaza şi oxigenaza, etc). Deci şi aceste elemente sînt indispensabile în desfăşurarea normală a proceselor biosintetice şi nu trebuie subestimate.

1.2. Necesarul de oxigen

Oxigenul este furnizat microorganismelor în primul rînd de diferiţii nutrienţi şi de apa din compoziţia mediilor de cultură. Din cauza solubilităţii sale scăzute, oxigenul aflat în soluţie este utilizat foarte repede de către bacteriile aerobe ce cresc în sistemul de cultivare. Aceasta face ca densitatea atinsă de o cultură să fie mult limitată de rata de solvire a oxigenului în lichid.

In culturile aerate, pe flacoane agitate, necesităţile de aerare sînt mai limitate, ele situîndu-se la 1-2 mg/g de substanţă uscată.

In instalaţii industriale, unde se măreşte mult aria interfaţei aer-lichid, în special prin folosirea tehnicii de barbotare a aerului şi de amestecare a lichidelor, creşterea microorganismelor

este mai intensă, dar poate şi ea să devină destul de limitată cînd necesităţile de oxigen nu sînt satisfăcute corespunzător.

In raport cu necesităţile în oxigen microorganismele se pot grupa:

1.Microorganisme stricte sau obligat aerobe, sînt acelea microorganisme care au nevoie absolută de prezenţa oxigenului şi care nu sînt capabile să trăiască în anaerobioză.

2.Microorganisme stricte sau obligat anaerobe, sînt microorganismele care nu se pot dezvolta în prezenţa oxigenului molecular şi ca urmare cultivarea lor trebuie să se facă în medii sărace în oxigen.

3.Microorganisme microaerofile, sînt acele microorganisme care cresc cel mai bine la concentraţii ale oxigenului în mediul de cultură foarte mici.

2.Microorganisme facultativ anaerobe, sînt microorganismele care au capacitatea de a se dezvolta atît în prezenţa cît şi în absenţa oxigenului. Unele dintre acestea cum sînt bacteriile lactice desfăşoară un metabolism de tip fermentativ, dar fără aer, chiar şi atunci cînd oxigenul este în cantitate suficientă, pe cînd altele îşi orientează metabolismul în funcţie de prezenţa sau absenţa oxigenului în mediul de cultură, fără să-şi modifice activităţile celulare.

2. Surse nutritive

Sursele nutritive utilizate de microorganisme sînt foarte diferite dar, cele mai multe necesită pentru desfăşurarea proceselor lor celulare un mediu în compoziţia căruia să intre: o sursă de energie, o sursă de carbon, o sursă de azot şi o sursă de factori de creştere.

2.1.Sursa de energie

Procesele de creştere a tuturor microorganismelor sînt endogene şi deci, energia necesară creşterii trebuie obţinută fie din oxidarea părţilor componente ale mediului, fie de la lumina solară. Energia obţinută pe una dintre aceste căi este înmagazinată în substanţe macroenergice. Dintre acestea "rezervorul" energic cel mai important al microorganismelor, şi nu numai a lor, este acidul adenozintrifosforic (ATP). La bacteriile fotosintetizante şi alge, producerea de ATP se realizează prin utilizarea energiei luminoase, pe cînd microo.ganis-

mele autotrofe îşi procură energia prin oxidarea compuşilor anorganici, iar microorganismele heterotrofe din oxidarea compuşilor organici.

In procesele industriale sursele cele mai obişnuite de energie sînt sursele de carbon, de aceea de multe ori sursa de carbon se confundă cu sursa de energie. Insă, orientările biotehnologice din ultimii 10 ani au arătat clar că între cele două surse există deosebiri nete, mai ales atunci cînd sursa de energie este un compus necarbonat.

2.2. Sursa de carbon

In funcţie de natura sursei de carbon folosită pentru creştere şi producerea de substanţe, microorganismele se pot grupa în:

1. microorganisme autotrofe, care folosesc CO_2 ca unică sau ca principală sursă de carbon celular;

2. microorganisme heterotrofe sau organotrofe la care sursa de carbon şi în egală măsură şi de energie este un compus organic

In cazul microorganismelor care folosesc substanţele organice, rolul de sursă de energie este asigurat prin faptul că oxidarea sau catabolizarea lor se face cu eliberare de energie şi produşi intermediari necesari proceselor celulare de biosinteză. Deci, compuşii organici cu carbon utilizaţi ca nutrienţi sînt produşii de plecare în sinteza celor cîteva mii de substanţe organice constitutive, cît şi a produşilor biotehnologici. Toate acestea se realizează cu consumuri energetice care la rîndul lor provin tot din procese metabolice de utilizare a sursei de carbon.

In mod frecvent, necesarul de carbon al unei celule este suplimentat totdeauna cu sursa de energie, însă bacteriile autotrofe şi cele fotosintetizante folosesc CO_2.

Calea pe care microorganismele heterotrofe metabolizează carbonul din substrat este importantă de cunoscut pentru a şti cît din întreaga cantitate este convertit în materialul celular propriu. S-a stabilit că microorganismele facultative încorporează circa 10% din carbonul substratului, cînd calea de metabolizare este aerobă, pe cînd cele obligate, pot încorpora cantităţile de carbon cuprinse între 50-80% din cantitatea totală de carbon a substratului. Acestea sînt cele mai importante pentru producerea de proteine microbiene. Este cunoscut că 50%

din greutatea uscată a celulelor este constituită din carbon, şi pe această bază se poate calcula cantitatea de carbon care trebuie adăugată la mediu pentru a obţine o anumită greutate de masă celulară. Dacă de pildă dorim să obţinem 40 g/l celule uscate, cînd metabolismul este aerob, iar sursa de carbon este reprezentată de glucoză, atunci cantitatea necesară pentru obţinerea celor 40 g/l de celule se va obţine prin următorul calcul simplu:

$$40 \times 180/72 = 100 \text{ g glucoză}$$

2.3. Sursa de azot

Azotul este necesar în cantităţi mari deoarece reprezintă aproximativ 10% din greutatea uscată a celulei microbiene. In celulă, azotul este încorporat sub formă de grupări $-NH_2$.

Sursa de azot poate fi reprezentată de amoniac sau de sărurile de amoniu, pentru cele mai multe microorganisme de interes industrial. Insă, unele microorganisme necesită surse de carbon organic pe care creşterea este mult mai bună, iar randamentele de producţie superioare.

Cantitatea de azot necesară microorganismelor de interes industrial este în strînsă dependenţă cu posibilităţile genetice ale producătorului . S-a constatat că atunci cînd microorganismul solicită cantităţi mari de azot şi capacitatea metabolică de asimilare a sa este mare, cantitatea de produs este superioară, iar randamentul de producţie pe măsură.

Compuşii organici necesitaţi de multe procese industriale microbiene sînt relativ scumpi, din care cauză s-a recurs la utilizarea unor surse cum ar fi: soia, arahidele, făina de peşte apele de malţificare, extractul de drojdii, serul, caseina sau unele lizate ale materialelor bogate în proteine.

In raport cu conţinutul de azot din celula microbiană se poate calcula conţinutul minim necesar [illegible] medii de interes industrial. Calculele se vor face în funcţie de randamentul celular al fiecărui microorganism. De exemplu, cînd azotul se adaugă sub formă de NH_3, în reţeta de mediu se calculează 10 părţi azot pentru 100 g biomasă uscată produsă.

3. Factori de creştere.

Încă din anul 1901 Wildiers a observat că levurile nu se pot dezvolta pe medii de cultură sintetice, decît dacă li se adaugă extract de levuri, extracte vegetale sau gălbenuş de ou. Prin urmare, mediul sintetic nu satisface nevoile metabolice ale levurii, în timp ce adăugarea de extracte sau gălbenuş de ou îmbogăţesc mediul, stimulînd creşterea acestuia.

S-a constatat ulterior că aceste produse conţin unele vitamine şi aminoacizi cum ar fi: meroinozitolul, acidul pantotenic pirodoxina, acidul nicotinic, biotina, aneurina, beta-alaina, L-lucină , etc., toţi aceştia jucînd rol de factori de creştere.

După Looff (1943) factorii de creştere sînt acele substanţe pe care un microorganism dat este incapabil să le sintetizeze în cursul metabolismului său şi în absenţa cărora procesele sale metabolice sînt imposibil de realizat.La unele microorganisme însă, factorii de creştere sînt de origine endogenă, fiind elaboraţi prin propriile sale procese metabolice, astfel încît prezenţa lor în mediu de cultură nu este necesară.In funcţie de natura lor chimică factorii de creştere pot fi grupaţi în trei categorii:

a)aminoacizi - sînt factorii de creştere necesari în biosinteza proteinelor;

b)purine şi pirimidine - sînt acei factori de creştere indispensabili în sinteza acizilor nucleici (ADN şi ARN), precum şi sinteza unor coenzime;

c)vitaminele - sînt factorii de creştere necesari în sinteza unor enzime, în care caz joacă rol de grupări prostetice. Ele au rol major şi în sinteza unor coenzime.

Factorii de creştere indiferent cărei categorii aparţin sînt necesari în cantităţi mici, ei jucîndu-şi rolul într-un anumit moment sau punct din metabolismul producătorului, prezenţa lor făcînd posibilă continuarea sau blocarea căii metabolice pentru care au fost destinaţi.

4. Căi de conversie a surselor nutritive

Microorganismele ca entităţi biologice uni- sau pluricelulare sînt echipate cu o serie de sisteme şi mecanisme celulare pe baza cărora reacţiile biochimice ce au loc la nivelul lor, pot să le pună la dispoziţie energia şi elementele biogene

ce sînt preluate sau sînt obţinute din mediul de cultură şi sînt utilizate în procese de biosinteză a propriilor constituienţi celulari sau pentru alte activităţi.

Toate aceste procese se realizează printr-o reţea complicată şi variată care formează căile metabolice celulare. Aceste căi au rolul de a dirija fluxul metaboliţilor în celulă, iar prin intermediul căilor individuale şi datorită sensibilităţii lor faţă de nivelul intracelular al produşilor finali se asigură coordonarea şi autoreglarea proceselor metabolice.

Deci, căile metabolice nu sînt altceva decît secvenţe de reacţii chimice, catalizate enzimatic, care permit microorganismului respectiv să-şi obţină din sursele nutritive, atît compuşii necesari propriilor sinteze, cît şi energia necesară realizării acestora. La microorganisme, pînă în prezent, se cunosc patru tipuri de căi metabolice:

1. căi catabolice;
2. căi anabolice;
3. căi amfibolice;
4. căi anaplerotice.

4.1. Căi catabolice

Căile catabolice reprezintă o succesiune de reacţii biochimice implicate în degradarea substanţelor nutritive din mediu şi eliberarea de energie necesară desfăşurării procesului celular. Acest lanţ de reacţii este cunoscut sub denumirea de reacţii catabolice, iar produsul este cunoscut sub numele de catabolit sau intermediar catabolic.

Ca regulă generală reacţiile de catabolism evoluiază în trei faze (Fig.26):

-Faza I corespunde degradării moleculelor sursei nutritive la unităţi mici, constitutive. Astfel, proteinele sînt degradate la aminoacizi, glucidele la hexoze, lipidele la acizi graşi şi glicerol sau alţi alcooli.

-Faza a II-a corespunde etapei în care diferitele micromolecule rezultate în faza anterioară sînt degradate incomplet, eliberîndu-se 1/3 din energie, CO_2, H_2O şi un număr relativ mic de intermedieri metabolici.

Ceea ce este caracteristic pentru această fază decurge din faptul că, cu toată marea lor varietate, căile catabolice

duc de la sursa primară de carbon la un număr redus de intermediari (aproximativ 12) ce aparţin căilor centrale.

-Faza a III-a are o evoluţie diferită în funcţie de natura

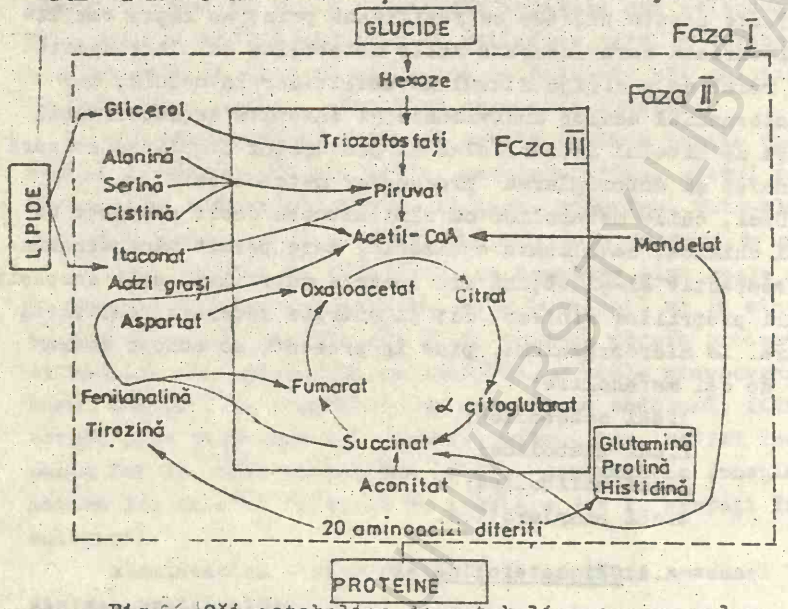


Fig.26. Căi catabolice de metabolizare a surselor nutritive (după Kornberg,1965).

fiecărui microorganism. In cazul microorganismelor aerobe care pot metaboliza sursele nutritive integral (pînă la CO_2 şi H_2O); calea de desfăşurare a acestei faze şi de eliberare a energiei este ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs), cuplat cu fosforilarea oxidativă.

Microorganismele anaerobe care nu pot efectua conversia completă a sursei de carbon la CO_2 şi H_2O realizează această fază prin reacţii de fermentaţie (alcoolică, lactică, butirică, propionică, acetobutirică, etc) în care produşii căilor metabolice servesc, direct sau indirect, ca donori, respectiv acceptori de H, în secvenţe de reacţii de oxidoreducere cuplate. Energia eliberată acum este mult mai redusă ca în cazul microorganismelor aerobe.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2. Căi anabolice

Căile anabolice reprezintă o înşiruire de reacţii biochimice prin care intermediarii căilor centrale de metabolism sînt integraţi în procesele de biosinteză a unor componenţi macromoleculari celulari. Căile anabolice au ca punct de plecare, de multe ori, intermediari ai căilor centrale, foarte diferiţi de cei care rezultă din catabolismul compusului respectiv. Acest fenomen, se explică prin faptul că etapele enzimatice componente ale celor două tipuri de căi (catabolice şi anabolice) sînt diferite sau au cel mult numai o foarte mică asemănare. De exemplu, catabolismul serinei duce la formarea de piruvat, în timp ce sinteza ei (procesul anabolic) începe de la 3 - fosfoglicerat.

Căile catabolice şi anabolice pentru două substanţe diferite nu sînt comple reversibile şi sînt numai parţial comune. De exemplu, degradarea glicogenului la acid lactic este catalizată de 12 enzime, dintre care numai 9 catalizează reacţiile reversibile, pentru celelalte căi, din considerente energetice se folosesc căi ocolite, care implică enzime diferite şi intermediari diferiţi. Existenţa unor căi paralele pentru reacţiile producătoare de energie şi pentru cele care consumă energie este o necesitate; degradarea unei molecule organice complexă este, din punct de vedere energetic, un proces "la vale" (down hill) în care are loc formarea ATP-ului din ADP şi P_i pe baza energiei libere produsă în timpul degradării diferitelor molecule. Procesele de biosinteză sînt din punct de vedere energetic procese "la deal" (up hill) care necesită consum de energie, şi sînt însoţite de degradarea ATP-ului la ADP şi P_i.

Reacţiile biosintetice ce corespund căilor anabolice se realizează tot în trei faze succesive, în sensul invers celor prezentate în figura 26. Procesul ar consta în conversia micromoleculelor din faza a III-a a procesului de catabolism la molecule mai mari - blocuri de construcţie celulară - ce reprezintă faza a II-a, care în final sînt ansamblate în macromolecule de proteine, lipide şi glucide.

Căile anabolice au ca punct de plecare un număr limitat de molecule precursor de la care evoluiază divergent şi ramificat pentru a se realiza gama largă de molecule ce constituie componenţii celulari.

4.3. Căi amfibolice

Căile amfibolice sînt acele căi metabolice centrale care îndeplinesc în acelaşi timp funcţia de eliberare de energie şi cea de furnizare a unor precursori pentru biosinteză.

Descoperirea acestor căi aparţine lui Davis şi Gilvarg (1961) care au studiat un mutant de E.coli incapabil să formeze citrat şi lipsit de posibilitatea de a oxida glucoza. Acest mutant era capabil să-şi obţină energia pe cale nespecifică, glicolitică, deci era incapabil de a urma ciclul Krebs şi de a face sinteza acidului glutamic şi a familiei de aminoacizi derivaţi din acesta (glutamină, prolină şi arginină). Ca urmare, mutantul nu se putea dezvolta pe medii lipsite de glutamat sau alfa-cetoglutarat, dar creştea foarte bine pe medii care conţineau ca unică sursă de carbon acidul glutamic sau precursorul său prolina. In aceste condiţii, deşi formarea de citrat este blocată, reacţiile din acele părţi ale căilor centrale neafectate de leziunea metabolică produsă de mutaţie sînt suficiente pentru furnizarea precursorilor necesari sintezelor celulare.

4.4. Căi anapleotice

Deoarece intermediarii căilor amfibolice sînt în permanenţă îndepărtaţi, pe de o parte în cursul fazei a III-a a catabolismului, cu eliberarea de energie şi, pe de altă parte, prin utilizarea lor în diferite biosinteze, funcţionarea multor cicluri este condiţionată de asigurarea unei reaprovizionări permanente cu intermediarii utilizaţi. Această funcţie este asigurată de o serie de căi metabolice auxiliare - căile anapleotice.

O cale anapleotică este reprezentată de una sau mai multe etape centralizate, prin care se formează metabolitul sau metaboliţii, necesari celorlalte căi metabolice. Deci, aceste căi ar putea fi considerate căi suplimentare de producere a intermediarilor metabolici.

4.5. Importanţa practică a cunoaşterii exigenţelor nutritive

Funcţionarea şi interacţiunile celor patru tipuri de căi metabolice are loc în mod perfect coordonat, datorită complexelor reacţii care asigură reglarea activităţii lor şi datorită

posibilităţilor de adaptare a microorganismelor la mediile în care trăiesc.

Cunoaşterea exigenţelor nutritive a unui microorganism, oferă posibilitatea intuirii căilor sale metabolice şi posibilităţilor sale de biosinteză a produsului pentru care este cultivat. O cunoaştere necorespunzătoare a exigenţelor microorganismului producător, sau utilizarea în reţetele de mediu a ingredienţilor necorespunzători cerinţelor acestuia, poate duce la blocarea sintezei unor substanţe şi în consecinţă, la scăderea randamentului şi producţiei.

4.Procese metabolice la microorganisme

4.1.Procese catabolice

Substanţele nutritive nu pot fi asimilate de microorganisme decît după ce au pătruns în citoplasmă, traversînd peretele celular şi membrana plasmatică. Dar,cele mai multe dintre substanţele nutritive sînt substanţe cu molecula mare şi greutate moleculară mare şi pentru a pătrunde în celulă trebuie, în prealabil, descompune (catabolizate) în molecule cu greutate moleculară mică. Această funcţie de descompunere este îndeplinită de enzimele hidrolitice eliberate de microorganisme în mediul de cultură. In urma hidrolizei substanţelor nutritive, rezultă molecule mici, cum ar fi de exemplu: mono-şi dizaharide, în cazul hidranţilor de carbon, peptide şi acizi aminici, în cazul proteinelor, acizi graşi şi glicerol, în cazul lipidelor şi nucleozide şi fosfaţi minerali, în cazul acizilor nucleici. Aceşti produşi de de hidroliză pot pătrunde prin peretele celular şi membrana plasmatică în mod pasiv, însă în acest caz traversarea este lentă şi singură nu poate asigura metabolismul celular. Pe lîngă acest mecanism de transport, microorganismele şi-au structurat la nivelul membranelor plasmatice agenţi transportori specializaţi, numiţi permiaze, prin intermediul cărora substanţele rezultate din hidroliză sînt introduse rapid şi activ în celulă.

Permiazele sînt enzime inductibile, de aceea cînd în mediul de cultură se găseşte un hidrat de carbon, de exemplu glucoza, în membrana plasmatică se sintetizează glucozilpermiaza care o transportă în citoplasmă în mod activ, unde va intra în ciclul de metabolizare specific.

5.1.1.Catabolismul substanţelor de natură glucidică

Substanţele de natură glucidică pot fi hidrolizate şi utilizate ca surse de carbon şi energie de către toate microorganismele aerobe. Prin sistemele lor enzimatice, microorganismele pot hidroliza substanţele de natură glucidică pînă la glucoză, ea reprezentînd forma principală sub care aceste substanţe sînt utilizate în metabolismul celular. De exemplu, celuloza va fi hidrolizată de către microorganismele celulozolitice care produc celulaze (enzime hidrolitice)la celobioză, iar aceasta într-o etapă următoare va fi hidrolizată la glucoză. Amidonul este hidrolizat de microorganismele amilolitice ce produc enzime specifice -amilaze - la dextrine şi maltoză. Maltoza este apoi clivată în două molecule de glucoză, iar dextrinele sînt şi ele clivate în alte resturi maltozice metabolizabile. Există şi microorganisme care hidrolizează direct amidonul la glucoză.Acestea s-ar părea să prezinte căi de biosinteză mai rapide şi mai eficiente.

Pectina, poate di hidrolizată de microorganismele pectinolitice (bacterii şi fungi) care posedă sisteme enzimatice formate din mai multe enzime din care două sînt esenţiale. Acestea sînt: pectinesteraza şi poligalacturonidaza. Sub acţiunea lor pectina este hidrolizată la acid galacturonic care la rîndul său sub acţiunea unor reductaze, dehidraze şi chinaze este transformat în 2-ceto -3-dexozi - 6 - fosfogluconat produs metabolizabil.

Lactoza este hidrolizată de microorganismele ce produc beta-galactoză. Sub acţiunea acesteia lactoza este hidrolizată într-o moleculă de glucoză şi una de galactoză.

Produsul de hidroliză a celor mai multe substanţe de natură glucidică este glucoza sau alţi produşi ce pot fi cataboliza-ţi pe căi metabolice specifice.

5.1.1.1.Calea Embden-Meyerhof-Parnas

Calea Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) este cunoscută şi sub numele de calea glicolizei sau hexozodifosfatului. Ea reprezintă calea majoră de catabolizare a glucozei la cele mai multe microorganisme. Pe această cale substanţele nutritive de natură glucidică, sub formă de glucoză, sînt încorporate în substanţe celulare proprii, ca urmare a transformărilor enzimatice şi ener-

getice a acesteia (fig.27).

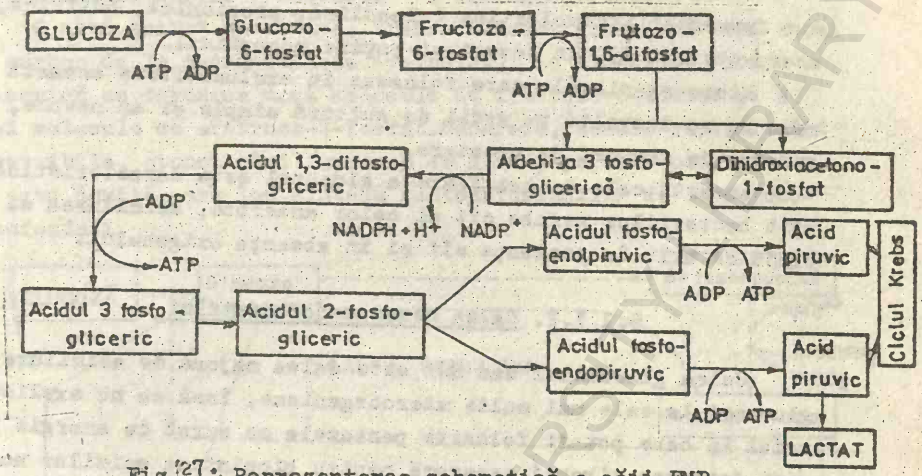


Fig. 27. Reprezentarea schematică a căii EMP (după Zarnea, 1984)

Inițial, glucoza este fosforilată cu formare de glucozo-6-fosfat. Transformarea sa poate avea loc fie la nivel transmembranar sau fie intracelular. Ulterior glucoza-6-fosfatul este convertit la fructozo-6-fosfatul, iar acesta în prezența acidului adenozintrifosforic (ATP) care cedează un radical P_i este transformată în fruntozo-1,6-difosfat. Acum urmează reacția caracteristică a căii EMP, și anume, scindarea fructozo-1,6-difosfatului (aceasta explică denumirea de calea hexozodifosfatului) în două trioze: aldehida 3-fosfoglicerică și dihidroxiacetonofosfatul. Intre aceste două trioze se păstrează un anumit echilibru, datorită unei enzime triozoizomeraza care mediază transformarea celor doi compuși într-o direcție sau alta a căii.

Oxidarea triozofosfaților este cuplată cu reducerea nicotinadinin-dinuclectidei (NAD^+) care conduce la formarea a două molecule de acid 1,3 - difosfogliceric, care vor fi convertite la rîndul lor la două molecule de acid 3-fosfogliceri cu eliberarea unei cantități corespunzătoare de energie (ATP). Cele două molecule de acid 3-fosfogliceric, sînt transformate enzimatic în două molecule de acid 2-fosfogliceric, acesta va fi transformat în două molecule de acid fosfoenolpiruvic care în fin vor forma două molecule de acid piruvic ce vor fi metabolizate mai departe pe calea ciclului Krebs pînă la CO_2, H_2O și energie.

B.C.U. „I. Creangă" IAȘI BIOLOGIE

Calea EMP se întîlneşte în special la bacteriile care produc fermentaţii homolactice (alcoolică, propionică, butirică, acetonobutirică), la levuri şi puţine mucegaiuri.

Microorganismele care folosesc în exclusivitate această cale nu se dezvoltă pe medii de cultură simple şi au nevoie, în general de factori de creştere.

Această cale de asimilare a glucozei este caracteristică atît bacteriilor aerobe cît şi celor anaerobe, asimilarea ei făcîndu-se atît în prezenţa cît şi în absenţa oxigenului.

5.1.1.2. Calea hexozomonofosfatului

Calea glicolizei sau EMP este calea majoră de asimilare a glucozei la cele mai multe microorganisme, însă ea nu explică modul în care pot fi folosite pentozele ca sursă de energie şi nici formarea ribozei necesară pentru biosinteza acizilor nucleici. Această explicaţie o dă însă calea hexozomonofosfatului sau calea pentozofosfaţilor. Această cale a fost descoperită de Warburg-Dickens-Horecker fapt pentru care le poartă şi numele.

In general, calea hexozomonofosfatului funcţionează la microorganismele care utilizează ca surse de carbon hexozele, pentozele sau alte glucide ce nu sînt metabolizate pe calea EMP, evitînd-o, fapt pentru care ea mai poartă şi numele de şuntul hexozomonofosfatului.

Calea hexozomonofosfatului are două etape principale(fig.28): prima etapă asigură utilizarea hexozelor şi formarea de ribulozo -5-fosfatului pe o cale oxidativă, iar a doua converteşte pentozofosfaţii la fructozo-6-fosfat şi aldehida -3-fosfoglicerică pe o cale neoxidativă.

Pe calea oxidativă are loc, iniţial, oxidarea glucozo-6-fosfatului la ribulozo-5-fosfat, cu eliberarea de $NADPH_2$ şi CO_2. Ulterior, ribulozo-5--fosfatul este izomerizat la ribozo-5-fosfat sau este epimerizat la xilulozo-5-fosfat. Tot pe cale oxidativă glucoza poate fi oxidată şi direct la ribulozo-5-fosfat.

Pe cale neoxidativă, are loc conversia pentozofosfaţilor la fructozo-6-fosfat şi aldehida -3-fosfoglicarică. In aceste reacţii de transformare, o enzimă specifică, transcetolaza, transferă un fragment de doi atomi de carbon de la xiluloză la riboză-5-fosfat, determinînd formarea unui monoglucid cu 7 atomi de carbon - sedoheptuluozo-7-fosfatul - şi un compus cu

trei atomi de carbon - aldehida - 3-fosfoglicerică.

O altă enzimă specifică, transaldoleza, transferă trei atomi de carbon de la sedoheptulozo -7-fosfatul la aldehida-3-fosfoglicerică cu formarea unei molecule de fructozo-6-fosfat şi a unei molecule de eritrozo-4-fosfat.Deoarece, aceste reacţii sînt reversibile, atunci cînd formarea de $NADPH_2$ pe cale oxidativă nu este dorită, are loc sinteza pentozofosfaţilor de la hexozomonofosfaţi.

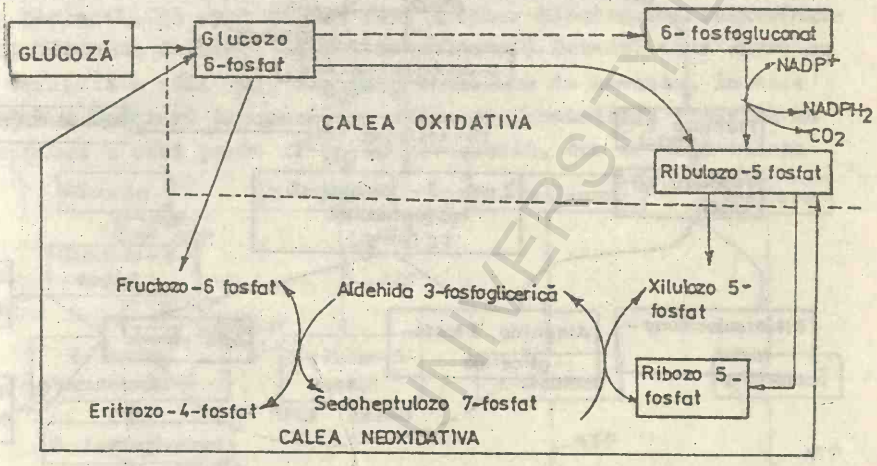


Fig.28. Reprezentarea schematică a principalelor etape de catabolizare a glucozei pe calea hexozomonofosfatului(după Zarnea,1984).

La cele mai multe microorganisme aerobe, aproximativ 28% din glucoză este metabolizată pe această cale.Spre deosebire de calea EMP, calea hexoromonofosfatului permite funcţionarea reversibilă a enzimelor sale, fapt ce permite realizarea conversiei hexozelor la pentoze, în special la ribozo-5-fosfat, necesar/e în sinteza acizilor nucleici. De asemenea, ea este implicată într-o măsură importantă în metabolismul biosintetic, deoarece furnizează celulei metaboliţii necesari sintezelor de aminoacizi aromatici şi de vitamine.

5.1.1.3. Calea Entner-Doudoroff

Calea Entner-Doudoroff(ED) a fost descoperită numai la unele bacterii din genul Pseudomonas, la care s-au studiat şi mecanismele de realizare a ei.

Primul intermediar al acestei căi este glucozo-6-fosfatul care este oxidat pe o cale asemănătoare celei a HMP, la 6-fosfogluconolactonă care printr-un proces de hidratare trece în 6-fosfogluconat (Fig.29).

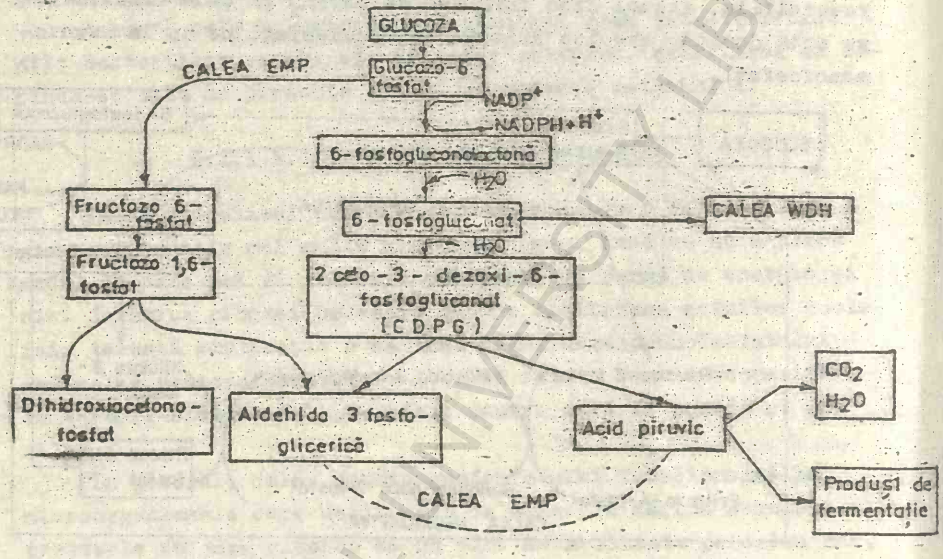


Fig.29. Reprezentarea schematică a căii Entner-Doudoroff și a interconexiunilor sale cu celelalte căi (după, Zarnea, 1984)

6-fosfogluconatul, printr-o reacție de dehidrogenare formează un compus intermediar caracteristic: 2-ceto-3-dezoxi-6-fosfogluconatul (CDPG). In ultima etapă, acesta este scindat la acidul piruvic și aldehida-3-fosfoglicerică. Aldehida-3-fosfoglicerică poate fi metabolizată mai departe pe calea EMP cu formare de piruvat, 2 moli de ATP și un mol de $NADH_2$, sau pe calea HMP pe care cale se formează percursorii pentru biosinteze ADN, ARN, vitamine și acizi aminici aromatici.

Este posibil ca în condiții metabolice diferite, cînd necesarul de energie este mare, glucoza, încă din primele etape ale căii să intre în calea EMP de metabolizare.

După cum se poate constata, această cale prezintă multiple posibilităţi de catabolizare a glucozei în funcţie de necesităţile microorganismului în energie, intermedieri metabolici sau alte substanţe necesare diferitelor procese biosintetice.

6.1.1.4. Calea fosfocetolazei

Calea fosfocetolazei este prezentă numai la un grup limitat de bacterii, în special, la cele lactice heterofermentative(care pot fermenta diferite tipuri de zaharuri).Această cale apare ca o variantă a căii HMP, dar spre deosebire de aceasta, în care glucoza iniţiază procesul, pe calea fosfocetolazei produsul de iniţiere a căii poate fi şi un alt glucid, cum ar fi D-riboza

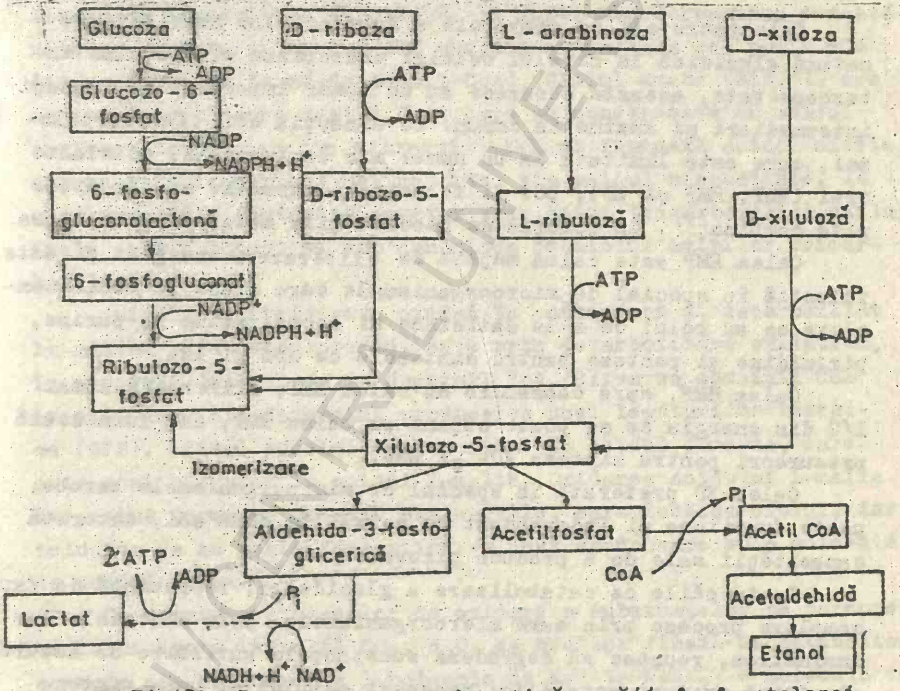


Fig.30. Reprezentarea schematică a căii fosfocetolazei (după, Zarnea, 1984).

L-arabinoza sau D-xiloza. Fiecare dintre aceste surse glucidice sînt convertite în cele din urmă la ribulozo-5-fosfat (Fig.30). Ribulozo-5-fosfatul este izomerizat la xilulozo-5-fosfat, care este clivat de o enzimă specifică, fosfocetolaza, la aldehide -3-fosfoglicerică metabolizată în continuare pe calea EMP, la piruvat şi în final la lactat şi acetilfosfat. Acest compus macroergic , acetilfosfatul, poate fi convertit la etanol sau acetat. Conversia sa la acetat se face cu conservarea de legături macroergice pe molecula de acetil-CoA.

5.1.1.5. Interconexiunea căilor de catabolizare a glucozei.

Cele patru căi de conversie a substanţelor nutritive de natură glucidică la nivelul celulei microbiene sînt strîns interconectate, aceasta deoarece au un număr important de compuşi intermediari şi enzime în comun. Cu excepţia căii fosfocetolazei, care este limitată la un număr mic de bacterii, celelalte trei (EMP, HMP şi ED), pot fi folosite alternativ sau în diferite combinaţii, în funcţie de necesităţile metabolice celulare.

Calea EMP este calea majoră de eliberare a energiei şi este folosită în special de microorganismele care cresc pe medii complexe ce au rolul de a le satisface şi necesităţile în purine, pirimidine şi pentoze pentru sintezele de ADN şi ARN.

Calea HMP, spre deosebire de calea EMP, eliberează numai 1/2 din energia ce se poate obţine pe calea EMP, dar furnizează precursori pentru sinteza ADN şi ARN.

Calea ED preferată în special de microorganismele aerobe, poate funcţiona şi independent de celelalte două căi, datorită capacităţii sale de a produce piruvat.

Toate căile de catabolizare a glucidelor, reprezintă de fapt complexe procese prin care microorganismele, prin sistemele lor enzimatice, reuşesc să degradeze substanţele nutritive de natură glucidică, produşi metabolici necesari celulei şi unor sinteze de substanţe biologice, procurîndu-şi totodată şi energia necesară desfăşurării acestor procese.

5.1.1.6.Ciclul acizilor tricarboxilici

Ciclul acizilor tricarboxilici (ATC), numit şi ciclul acidului citric sau ciclul Krebs, reprezintă calea de oxidare completă a principalelor substanţe nutritive utilizate de microorganismele aerobe.

Prin intermediul căilor metabolice specifice, glucoza este catabolizată la acid pivuric, proteinele la aminoacizi, iar lipidele la acizi graşi. Toţi aceşti produşi sînt convertiţi la acetil-CoA şi incluşi pe această cale în treapta finală de catabolizare a lor. Aceasta se realizează pe calea ciclului Krebs, care îi descompune pînă la CO_2, H_2O şi energie.

Ciclul acizilor tricarbolxilici este prezent la o gamă largă de microorganisme (bacterii, levuri şi fungi filamentoşi) cultivate în condiţii de aerobioză. La multe microorganisme cercetările au arătat că ciclul ATC asigură oxidarea a cel puţin 90% din acetat (sub formă de acetil-CoA). Ciclul Krebs (Fig.31) are ca punct de plecare acetil CoA, care se condenseză cu acidul oxaloacetic, în prezenţa citratsintazei şi formează acidul citric, acesta este izomerizat mai departe, via acidul cisacetinic, la acid izocitric (datorită acestor trei acizi tricarboxilici, ciclul Krebs este cunoscut şi sub denumirea de ciclul acizilor tricarboxilici).

Acidul izocitric este oxidat în continuare şi decarboxilat la acidul alfa-cetoglutaric, care prin decarboxilare oxidativă, în prezenţa CoA, trece în succinil CoA. Clivarea succinil CoA la acid succinic determină producerea unei legături macroergice (GTP). Acidul succinic este oxidat la acidul fumaric, care este apoi hidratat la acidul L-malic. Oxidarea acidului L-malic determină formarea de acid oxaloacetic, care închide ciclul, iar reluarea sa se poate face printr-o nouă condensare cu o moleculă de acetil - CoA.

Ca urmare a proceselor de oxidare a substanţelor pe parcursul ciclului Krebs, rezultă CO_2, H_2O, ca produşi finali de matabolism, energie din reducerea a 3 molecule de NAD la $NADH_2$, o moleculă de FAD la $FADH_2$ şi GDP la GTP, precum şi prin trecerea GTP în ATP. Totodată, sînt puşi în libertate electroni şi protoni care vor intra în ciclul oxidării celulare participînd la procesele respiratorii. Pe lîngă funcţiile oxidative prezentate mai sus, ciclul

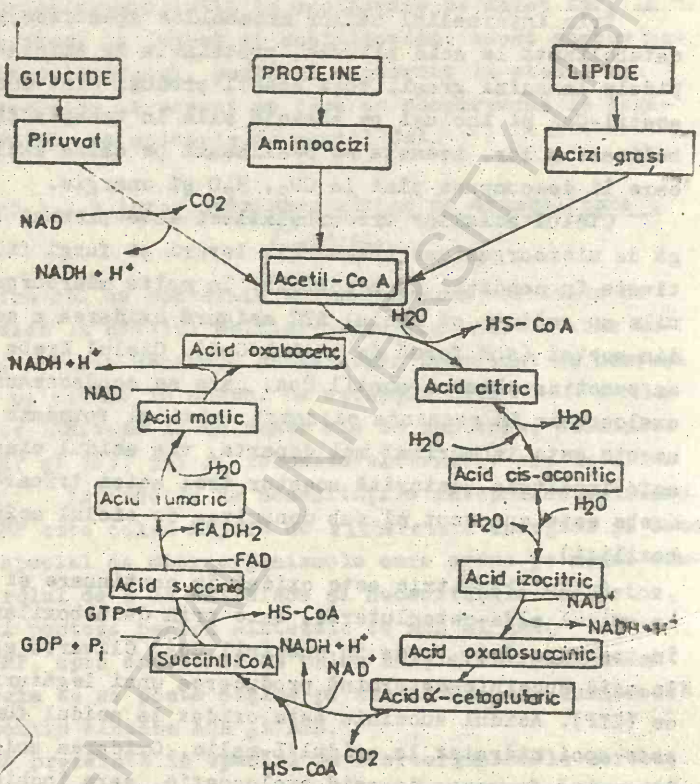


Fig. 31. Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs)

Krebs este şi un important rezervor de intermediari necesari proceselor biosintetice.

Ciclul Krebs funcţionează la bacterii la nivelul membranei plasmatice şi mai puţin la nivelul structurilor membranare de tip mezozomic, pe cînd la microorganismele eucariote (levuri şi fungi) funcţionarea sa are loc la nivelul mitocondriilor.

5.1.1.7.Ciclul glioxilatului

Unele microorganisme (bacterii şi fungi) au posibilitatea să-şi manifeste proprietăţile lor metabolice utilizînd ca unică sursă de carbon substanţe cu un număr mic de atomi de carbon (metanol, acetat, succinat etc). Aceste microorganisme posedă mecanisme moleculare care le permit să metabolizeze substratul carbonat în vederea procurării energiei şi intermediarilor necesari biosintezelor celulare. Mecanismele lor moleculare sînt reprezentate prin ciclul glioxilatului care poate să funcţioneze concomitent cu ciclul Krebs. Prin cuplarea sa cu ciclul Krebs, noul mecanism celular (ciclul glioxilatului) asigură o cale suplimentară de aprovizionare a celulei cu compuşi cu patru atomi de carbon, asigurînd totodată şi formarea de CO_2 ca urmare a proceselor de catabolism ce au loc la nivelul său.

Ciclul glioxilatului reprezintă o modificare, o abatere din calea ciclului Krebs, menită să asigure oxidarea acetatului la glioxilat(Fig.32). Pe această cale, etapele de oxidare a ciclului Krebs, între izocitrat şi succinat sînt ocolite. Oxidarea malatului la oxaloacetat completează ciclul. Malatul şi oxalilacetatul, produşi ai căii glioxilatului, pot fi convertiţi la piruvat şi fosfoenolpiruvat, care vor reprezenta puncte de plecare în unele reacţii de biosinteză celulară.

La bacterii ciclul Krebs ca şi cel al glioxilatului, nu sînt separate spaţial, ele funcţionînd în raport cu necesităţile microorganismului. Cînd mediul de cultură devine deficitar în sursa de bază (de exemplu glucoză) atunci microorganismul poate să utilizeze compuşi mai simpli cum ar fi de exemplu, cei cu doi atomi de carbon.

Deşi cele două cicluri au anumiţi intermediari comuni, funcţionarea lor este diferită, iar funcţiile şi ele total diferite. Ciclul Krebs asigură catabolismul acetatului cu eliberarea de energie, în timp ce ciclul glioxilatului are funcţii exclusiv asimilatorii, contribuind la sinteza acizilor dicarboxilici. Funcţionarea cuplată a celor două mecanisme face ca ele să se completeze reciproc în funcţie de necesităţile celulare.

Funcţionarea în mod preponderent numai a ciclului glioxilatului la unele microorganisme (Aspergillus niger) a determinat folosirea acestuia în practica industrială de producere a acidului citric.

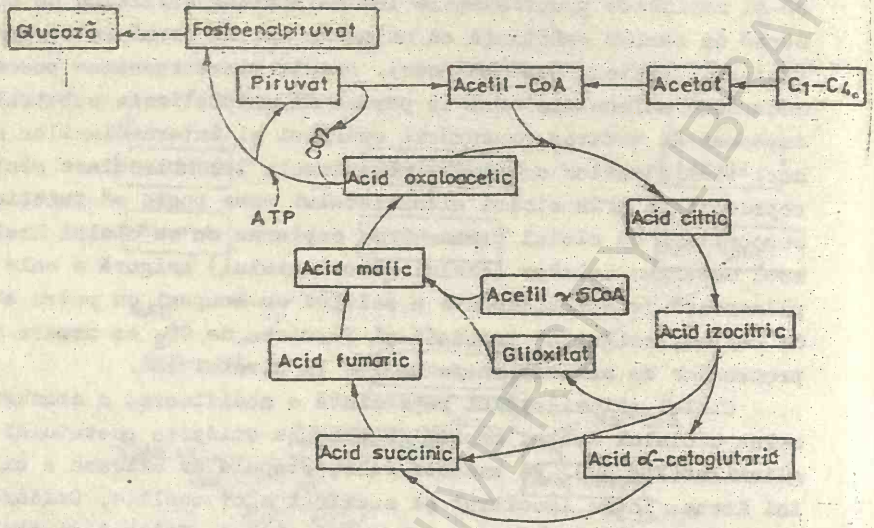


Fig. Ciclul glioxilatului şi conexiunile sale cu ciclul Krebs.

5.1.2. Catabolizarea substanţelor de natură proteică şi a aminoacizilor de către microorganisme.

5.1.2.1. Proteoliza

Asimilarea proteinelor şi aminoacizilor de către microorganisme se face tot prin procese catabolice, prin care aceste substanţe nutritive din mediul de cultură sînt introduse în celulă şi circuitul ei celular.

Proteinele din mediul de cultură înainte de a pătrunde în celulă sînt supuse proceselor de hidroliză pe care cale sînt descompuse pînă la fragmente moleculare mici - peptide - care sub această formă pot fi transportate în celulă. Hidroliza moleculară a proteinelor se face cu ajutorul enzimelor proteolitice, iar fenomenul este cunoscut sub numele de proteoliză. Peptidele la nivel celular sînt şi ele hidrolizate în molecule mai mici - aminoacizi - cu ajutorul unor enzime - peptidaze.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unele microorganisme nu produc proteaze, ci numai peptidaze, ceea ce le permite utilizarea ca sursă nutritivă numai a proteinelor hidrolizate.

Aminoacizii rezultaţi din hidroliza peptidelor pot să urmeze în celulă două căi: o parte pot fi folosiţi în procese de biosinteză proteică, iar o parte sînt supuşi unor procese catabolice de asimilare celulară.

5.1.2.2. Catabolizarea aminoacizilor

Catabolizarea aminoacizilor se face pe mai multe căi, dintre care două sînt mai importante şi anume:

a) catabolizarea prin dezaminare;

b) catabolizarea prin decarboxilare.

a) Catabolizarea prin dezaminare se poate face pe cale oxidativă sau pe cale reductivă.

-Dezaminarea pe cale oxidativă reprezintă calea cea mai comună şi are ca schemă generală dehidrogenarea enzimatică a aminoacidului cu formarea unui iminoacid. Iminoacidul la rîndul său este hidrolizat printr-o reacţie neenzimatică, cu formare

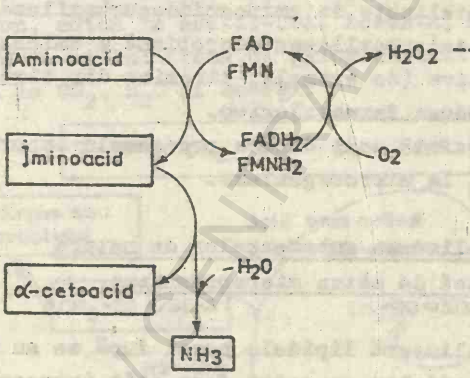


Fig.33. Schema dezarmării oxidative la microorganismele aerobe şi anaerobe.

de amoniac (NH_3) şi de alfa-cetoacid (Fig.33).

-Dezaminarea pe cale reductivă este prezentă aproape în mod exclusiv la microorganismele anaerobe. Dezaminarea reductivă are drept rezultat formarea unui acid organic saturat, după o reacţie în care donorul de hidrogen este $NADH_2$:

$$R - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH + NADH_2 \longrightarrow R-CH_2-COOH + NH_3 + NAD^+$$

Acidul organic saturat poate fi oxidat prin alte procese celulare, cum ar fi conversia sa la cetoacizi, pe care cale va fi decarboxilat oxidativ pînă la CO_2, pe cînd amoniacul poate fi inclus în procesele celulare de biosinteză a unor aminoacizi, cum ar fi biosinteza aminoacizilor pe calea ciclului ornitinic care conduce la acid glutamic şi arginină.

b)Catabolizarea prin decarboxilare. Decarboxilarea aminoacizilor reprezintă o cale majoră de metabolizare a aminoacizilor la microorganisme. Pe această cale aminoacizii sînt descompuşi pînă la CO_2 şi amina corespunzătoare după următoarea reacţie:

$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH \longrightarrow CO_2 + R - CH_2 - NH_2$$

Reacţiile de decarboxilare au loc la un număr foarte mare de microorganisme şi sînt catalizate de aminoaciddecarboxilaze. Unele amine produse prin decarboxilarea microbiană a aminoacizilor sînt farmacologic active (de exemplu, tiramina din tirozină), ele fiind folosite ca produse farmacologice.

Decarboxilarea reprezintă unul dintre procedeele importante prin care se formează CO_2 la microorganisme.

5.1.3. Catabolizarea substanţelor de natură lipidică de către microorganisme.

Microorganismele utilizează lipidele numai după ce au fost hidrolizate. Hidroliza lipidelor se poate face atît intracelular cît şi extracelular, cu ajutorul unor enzime cunoscute sub numele de lipaze. După locul unde acţionează, lipazele pot fi intracelulare (cele care acţionează în interiorul celulei) şi extracelulare (cele care acţionează asupra lipidelor în afara celulelor).

Lipazele sînt enzime nespecifice care acţionează asupra lipidelor hidrolizîndu-le în acizi graşi şi glicerol.

Glicerolul, ca produs de hidroliză, este metabolizat la nivelul celulei pe căile de asimilare a glucidelor , pe cînd

acizii graşi sînt metabolizaţi pe căi diferite.

Oxidarea acizilor graşi se face după o prealabilă activare a lor de către ATP, activare ce este urmată de cuplarea lor cu CoA, conform reacţiei:

$$CH_3-(CH_2)_n-COOH + ATP + HS-CoA \longrightarrow CH_3-(CH_2)_n-C(=O)\sim S-CoA + AMP + 2H_3PO_4$$

Etapa imediat următoare constă în hidrogenarea acidului gras sub acţiunea sistemului enzimatic FAD, din care unele enzime acţionează de preferinţă asupra acizilor graşi cu lanţ lung (C_{14} - C_{18}), iar altele asupra acelora cu lanţ mijlociu sau scurt. Rezultatul acestei oxidări este scurtarea lanţului acidului gras cu 2 atomi de carbon deoarece acetil - CoA care captează aceşti 2 atomi de carbon se eliberează din lanţul de reacţie. Procesul va fi reluat pînă la descompunerea întregului lanţ în fragmente de 2 atomi de carbon (Fig.34). Este prin urmare suficient ca acidul gras, indiferent de numărul atomilor de carbon din care este format lanţul, să fie activat de ATP şi cuplat cu CoA pentru a fi descompus treptat în unităţi de cîte 2 atomi de carbon, adică în acetil-CoA. Aceasta, într-o etapă următoare va intra în ciclul Krebs şi glioxilatului şi va fi metabolizată pînă la CO_2, H_2O şi energi.

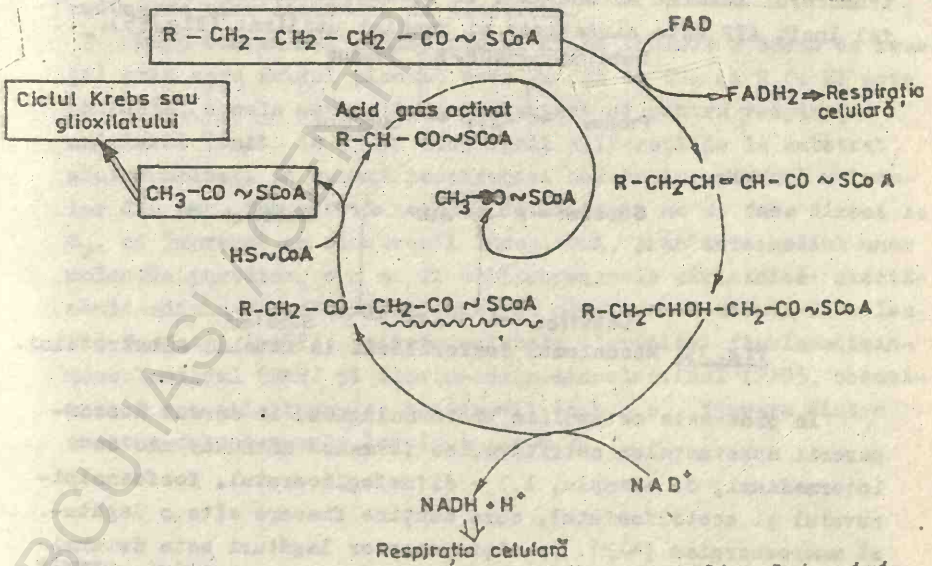


Fig.34. Reprezentarea schematică a catabolismului acizilor graşi (după Zarnea, 1984).

BCU IAŞI / CENTRUL VECHI / LIBRARY

Reacţiile prin intermediul cărora lanţul acidului gras se scurtează cu 2 atomi de carbon, poartă numele de beta-oxidare.

5.1.4. Procese energetice de catabolism la microorganisme.

Microorganismele îşi pot obţine energia necesară pentru creştere printr-un număr foarte mare de reacţii diferite. Energia liberă devenită disponibilă din reacţiile de oxidare a substanţelor nutritive poate fi utilizată prin captarea ei şi prin formarea de intermediari bogat energetic (ATP, GTP, acetil-CoA, etc). Acest proces este specific microorganismelor şi el reprezintă principala formă de conservare a energiei celulare.

Există la microorganisme două căi sau mecanisme de conservare a energiei:

a)Formarea energiei prin fosforilarea la nivelul substratului şi cu formare de ATP;

b)Formarea de ATP prin fosforilare oxidativă.

a) Fosforilarea la nivelul substratului

Acest proces nu implică participarea unui sistem transportor de electroni. Oxidarea unui anumit substrat este urmată de transferul imediat al energiei la o reacţie endergonică, în aşa fel încît ATP este sintetizat şi imediat utilizat (Fig.35).

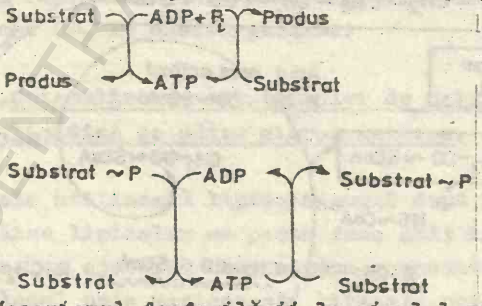


Fig.35. Mecanismul fosforilării la nivelul substratului.

In procesele metabolice biotehnologice, în cursul descompunerii substanţelor nutritive, se formează un număr mic de intermediari, de exemplu, 1,3 - difosfogliceratul, fosfoenolpiruvatul şi acetilfosfatul, care conţine fiecare cîte o legătură macroenergică (~P). Apariţia acestor legături este determinată de prezenţa unor reacţii de oxidare a substratului, urmate

de pierderea unor electroni şi formarea legăturii macroergice corespunzătoare între atomul de carbon oxidat şi molecula de fosfor anorganic (P_i). Intotdeauna, metabolizarea acestor compuşi este cuplată cu transferul grupării $\sim$ P la ADP şi formarea de ATP după schema:

Etapa I: $DH_2 + P_i \longrightarrow D \sim P + 2H^+$
Substrat — Intermediar+Electroni

Etapa II: $D \sim P + ADP \longrightarrow D + ATP$
Substrat defosforilat

Numărul acestor reacţii la macroorganisme este relativ mic. Desfăşurarea lor este catalizată de enzime specifice solubile în citoplasma celulară.

b) Fosforilarea oxidativă. Este procesul prin care cea mai mare parte din energia eliberată în cursul oxidării substanţelor nutritive pe calea ciclului Krebs este înmagazinată sub formă de ATP. Spre deosebire de fosforilarea la nivelul substratului, în cazul fosforilării oxidative, sinteza ATP este cuplată cu reacţiile de transport de electroni, prin intermediul cărora oxidarea unor compuşi organici sau a unor ioni anorganici este legată cu reducerea unor acceptori de electroni.

După cum am mai arătat ciclul Krebs include o serie de reacţii prin care acidul piruvic este oxidat la CO_2 şi H_2O. El este totodată, o cale centrală de biosinteză şi pentru respiraţia celulară. Ionii de H^+ şi electronii eliberaţi de la substrat sînt combinaţi în cursul respiraţiei aerobe cu oxigenul molecular din aer. Transferul ionilor de hidrogen nu se face direct la O_2, ci împreună cu electronii însoţitori, prin intermediul unor molecule purtător, cum ar fi dehidrogenazele piridinice: nicotinamid-adinin-dinucleotidul (NAD) şi nicotinamid-adinin-dinucleotid fosfatul (NADP), oxidoreductazele flavinice: flavin-adimin-monocleotidul (FMN) şi flavin-admin-dinucleotidul (FAD), coenzimele Q sau ubichinonele, citocromii (a,b,c,o), fiecare dintre acestea cu subgrupele lor (a, a_3; c, c_1).

Prin intermediul acestor purtători au loc o serie de reacţii de oxidoreducere prin care energia este eliberată fracţionat, iar surplusul este stocat în vederea utilizării ulterioare. Toate aceste reacţii au loc de-a lungul lanţului respirator (Fig. 36), la nivelul căruia se desăvîrşeşte respiraţia celulară.

Respiraţia celulară debutează, deci cu dehidrogenarea substratului de către dehidrogenaze NAD sau NADP. Prin hidrogenare substratul se oxidează, iar NAD sau NADP acceptă atomii de hidrogen şi se reduce devenind NADH + H^+. La bacteriile aerobe electronii de la NADH + H^+ şi NADPH + H^+ sînt preluaţi şi transportaţi de FMN sau FAD, care trec din forma oxidată în forma

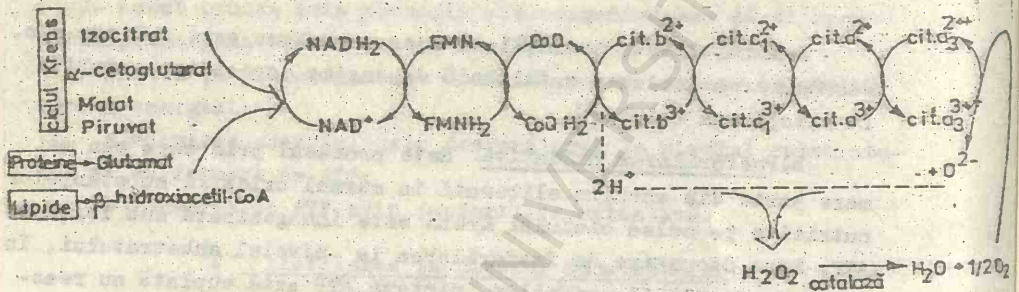


Fig.36. Reprezentarea schematică a principalelor etape ale procesului de respiraţie celulară şi de formare a ATP.

redusă ($FMNH_2$ şi $FADH_2$). Acestea la rîndul lor cedează atomii de hidrogen ubichinonei (coenzimei Q) care se reduce ($CoQ \longrightarrow CoQH_2$). Coenzima Q redusă, va fi la rîndul ei oxidată după o prealabilă disociere a atomilor de H în doi protoni ($2H^+$) şi doi electroni. Electronii sînt transferaţi lanţului citocromic care îi transferă pînă la ultimul său component citocromul a_3(citocromodaza), care în final îi cedează oxigenului molecular. Oxigenul molecular se reduce şi se transformă în oxigen ionic (O^{2-}), capabil să reacţioneze cu protonii de H^+ din mediu, formînd o moleculă de apă oxigenată (H_2O_2) care sub acţiunea catalizei este redusă la apă şi oxigen molecular (O_2) acesta va intra din nou în ciclul respirator.

Aceste reacţii succesive de oxidoreducere eliberează eşalonat energia. Surplusul de energie este stocat sub formă de ATP. Pe parcursul unui ciclu respirator complet rezultă energie sub formă de ATP în trei etape, fiecare dintre acestea corespun-

zînd perechii de H oxidat sau altfel spus, pentru fiecare moleculă de apă formată, rezultă 3 moli de ATP. Dacă ţinem seama de faptul că un mol de ATP înmagazinează 16 kcal, înseamnă că pentru fiecare moleculă de apă formată în procesul respiraţie celulare rezultă 48 kcal.

5.2. Procese de biosinteză la microorganism

Procesele de biosinteză la microorganisme sau procesele anabolice constau într-o serie de reacţii biochimice prin intermediul cărora se produc substanţele ce intră în diferitele sinteze celulare sau de metaboliţi. Mulţi dintre aceşti metaboliţi reprezintă substanţe biologice importante cu largă utilizare în diferite ramuri industriale, medicale sau alimentare.

Biosinteza constituienţilor celulari este condiţionată de prezenţa în mediul de cultură a unei surse adecvate de energie şi a unor cantităţi convenabile de compuşi cu greutate moleculară mică, utilizaţi ca precursori sau ca material de construcţie în biosinteză. Uneori, aceşti compuşi sînt prezenţi ca atare în mediul de cultură şi microorganismele îi dirijează direct în căile lor de biosinteză (Fig.37).

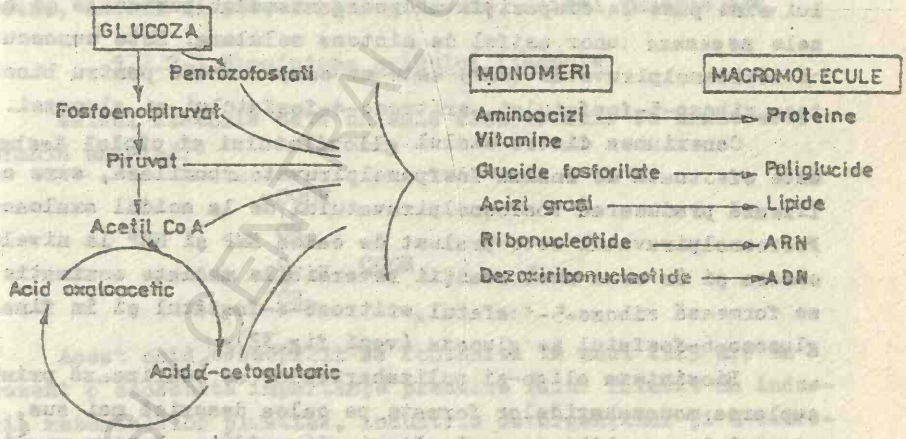


Fig.37. Schema generală a biosintezei constituienţilor celulari ai microorganismelor, plecîndu-se de la glucoză (după Gottschalk, 1979).

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In cele mai multe cazuri mediul de cultură nu poate furniza întreaga gamă de compuşi cu greutate moleculară mică, necesari biosintezelor, ce face ca aceştea să fie produşi de microorganisme. Pe căi catabolice speciale microorganismele, folosind substanţele din mediu îşi asigură rezerva de intermediari necesari proceselor biosintetice.

Formarea diferiţilor constituenţi celulari se realizează prin ansamblarea treptată, pornind-se de la precursorii organici cu greutate moleculară mică. Numărul maxim al compuşilor organici cu greutate moleculară mică folosiţi de microorganisme, fie ca precursori ai macromoleculelor, fie direct la constituirea structurilor celulare este de aproximativ 100 - 200 forme. Sinteza acestora se realizează plecîndu-se de la un număr mult mai mic de intermediari produşi ai căilor centrale ale metabolismului celular.

5.2.1. Biosinteza substanţelor de natură glucidică

La microorganisme, procesele de biosinteză a substanţelor de natură glucidică sînt relativ bine cunoscute. În aceste procese un rol importa[illegible] ciclul glioxilatului. Prin intermediul lui sînt puse la dispoziţia microorganismelor pentozele şi hexozele necesare unor astfel de sinteze celulare. Este cunoscut că fosfoenolpiruvatul (FEP) este un compus cheie pentru biosinteza ribozo-5-fosfatului, eritrozo-4-fosfatului şi glucozei.

Conexiunea dintre ciclul glioxilatului şi ciclul Krebs, este efectuată de enzima fosfpenolpiruvatcarboxilaza, care catalizează producerea fosfoenolpiruvatului de la acidul oxaloacetic. Fosfoenolpiruvatul este preluat de calea EMP şi HMP la nivelul cărora şi în urma unor reacţii reversibile mediate enzimatic se formează ribozo-5-fosfatul, eritrozo-4-fosfatul şi în final glucozo-6-fosfatul şi glucoza (vezi fig.32).

Biosinteza oligo-şi polizaharidelor se realizează prin cuplarea monozaharidelor formate pe calea descrisă mai sus, la nivelul lor stabilindu-se legături glicozidice. Pentru realizarea acestor legături este necesar ca unul dintre monozaharide să fie activat. Activarea lui se face prin legarea unui compus macroergic, uridindifosfatul (UDP). Procesul are loc în felul următor: mai întîi glucoza este fosforilată la C_1 de ATP, cu formarea de glucozo-1-fosfat. Reacţia este catalizată de o fos-

fochinază, apoi glucozo-1-fosfatul reacţionează enzimatic cu UDP rezultînd UDP-glucoza, aceasta poate reacţiona cu un alt monozaharid, formînd un dizaharid:

UDP - glucoză + glucozo-1-fosfat ⟶ trehalozo-1-fosfat

UDP - glucoză + fructofuranoză ⟶ zaharoză

Biosinteza polizaharidelor pleacă de asemenea de la UDP-glucoză care va fi cuplată cu un lanţ de cel puţin patru unităţi:

G - G - G - G + UDP - glucoză ⟶ G - G - G - G - G + UDP

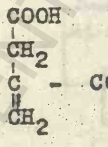
5.2.2. Biosintezaa acizilor organici

Microorganismele în general şi în special levurile şi fungii au capacitatea metabolică de a biosintetiza o serie de acizi organici, unii deosebit de importanţi pentru industrie. Aceştea se biosintetizează în mare parte prin procese de degradare anaerobă a hidraţilor de carbon şi prin oxidarea incompletă a lor.

In prezent prin biosinteză se obţin următorii acizi organici: acidul itaconic, acidul acetic, acidul propionic, acidul lactic, acidul citric, acidul gluconic, acidul fumaric, etc.

5.2.2.1. Biosinteza acidului itaconic

Acidul itaconic este un acid dicarboxilic cu următoarea formulă chimică:



Acest acid, descoperit de Konishita în anul 1929 are în prezent o deosebită importanţă practică fiind folosit în industria materialelor plastice, industria detergenţilor şi a fibrelor sintetice. El este utilizat şi ca aditiv la fabricarea lubrefianţilor.

Biosinteza acidului itaconic se realizează prin cultivarea fungului Aspergillus terrus pe un mediu cu glucoză sau cu alţi hidraţi de carbon.

Microorganismul are capacitatea metabolică de a oxida aceste substanţe la acid itaconic pe o cale încă necunoscută pînă în prezent. Se presupune totuşi că acidul itaconic ar rezulta din activarea acidului citric printr-un mecanism mai puţin cunoscut.

Studiile referitoare la dinamica procesului de biosinteză au arătat însă că iniţial are loc formarea acidului aconitic, apoi succinic şi tartric şi abia după aceea a acidului itaconic.

5.2.2.2. Biosinteza acidului acetic

Procesul de biosinteză a acidului acetic poate fi realizat de numeroase specii de bacterii aparţinînd în special genului Acetobacter.

In biosinteza acidului acetic se pleacă de la alcoolul etilic ca produs de fermentaţie, care este supus unui proces de dehidrogenare conform schemei din figura 38.

Fig. 38. Schema de biosinteză a acidului acetic

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

In urma dehidrogenării alcoolului etilic se formează acetaldehida, care fixează o moleculă de apă formînd hidratul de acetaldehidă. Hidratul de acetaldehidă este supus din nou unei dehidrogenări şi rezultă acidul acetic.

5.2.2.3. Biosinteza acidului lactic

Procesul de biosinteză a acidului lactic este realizat de bacteriile lactice aparţinînd genului Lactobacillus. Punctul de plecare în biosinteza acidului lactic îl reprezintă hexozele, care pot fi metabolizate pe calea glicolitică formîndu-se în final numai acid lactic sau pe calea ciclului pentozofosfaţilor,

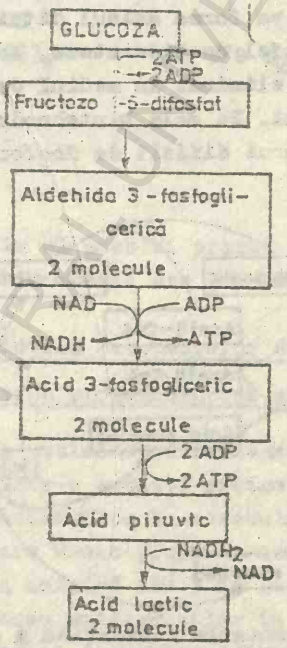


Fig.39. Reprezentarea schematică a etapelor de biosinteză a acidului lactic (calea fermentativă homolactică).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cînd pe lîngă acid lactic se produc şi urme de etanol, acid acetic, CO_2, manitol, etc.

In rezumat procesul de biosinteză a acidului lactic se poate realiza ca în figura 39:

După cum se poate constata, mecanismul de biosinteză este asemănător celui de fermentaţie alcoolică, cu deosebirea că acidul piruvic produs pe calea EMP este redus la acid lactic în loc să fie decarboxilat şi redus la etanol.

5.2.2.4. Biosinteza acidului citric

Biosinteza acidului citric este realizată de fungii filamentoşi aparţinînd genului Aspergillus şi Penicillium.

Acest proces de biosinteză are ca punct de plecare glucoza care este metabolizată pe calea EMP sau HMP pînă la acid piruvic care va fi convertit la acetil-CoA, iar aceasta prin condensare cu acidul oxaloacetic va forma acidul citric. La microorganismele specializate în astfel de biosinteze, acidul citric format pe această cale va fi eliminat în mediul de biosinteză, ca produs final al procesului. Pe cale biotehnologică aceasta se poate realiza prin crearea unui deficit de fosfor, fier, mangan şi zinc în mediile de cultură.

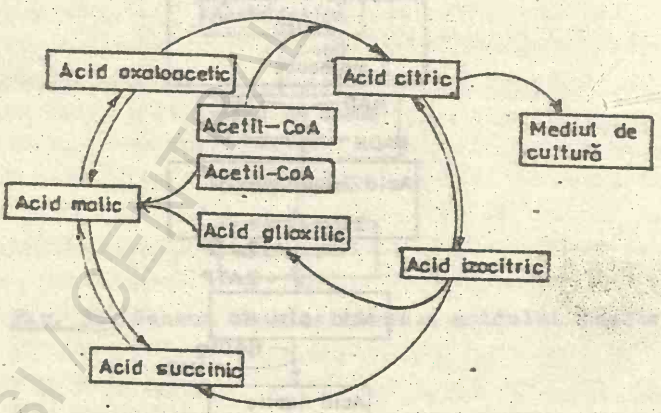


Fig.40 Reprezentarea schematică a căilor de biosinteză a acidului citric.

In general etapele procesului de biosinteză sînt:

Glucoza ⟶ piruvat ⟶ acetat + CO_2

Piruvatul + CO_2 ⟶ malat (sau oxaloacetat)

Malatul ——→ oxaloacetat

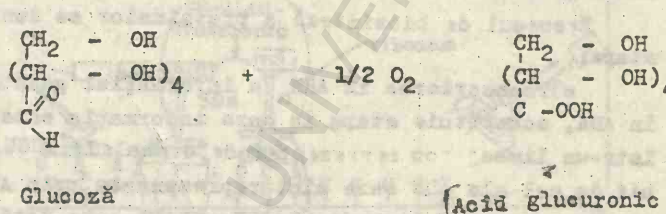
Oxaloacetatul + acetat ——→ acid citric

Căile de transformare a principalilor produşi implicaţi în biosinteza acidului citric sînt prezentate în Fig.40.

5.2.2.5. Biosinteza acidului glucuronic

Acidul glucuronic este produsul de biosinteză a fungilor aparţinînd genului Aspergillus. Se presupune că şi unele bacterii ar poseda capacitatea metabolică de biosinteză a acidului glucuronic. Printre acestea s-ar număra cele aparţinînd genului Acetobacter şi genului Pseudomonas.

Procesul de biosinteză are ca punct de plecare glucoza care este supusă unui proces de oxidare la funcţia aldehidică după următoarea reacţie:



Glucoză — Acid glucuronic

Mecanismul intim al acestui proces nu este cunoscut. Se presupune că această conversie are loc pe cale enzimatică.

5.2.3. Biosinteza substanţelor de natură proteică

5.2.3.1. Biosinteza proteinelor şi enzimelor

Macromoleculele proteice se formează din unirea celor 20 aminoacizi naturali într-o anumită ordine strict determinată genetic. Legarea aminoacizilor în molecula proteică se face prin legături peptidice care unesc gruparea carboxil (COOH) de la un aminoacid cu gruparea aminică (NH_2) de la alt aminoacid.

Secvenţionalizarea aminoacizilor în macromolecula proteică este într-o ordine strict determinată constituind structura primară a moleculei. Prin această secvenţionalizare rezultă lanţuri poleptidice care nu rămîn în această formă, ci se înrulează în jurul axului său formînd o structură de tip helical, cunoscută

sub numele de alfa-helix, sau elicea alfa, care dă structura secundară a proteinei. Aceste formaţiuni structurale la rîndul lor se replieză dînd o structură spaţială tridimensională care constituie structura terţiară a proteinei. Aceasta la rîndul ei va da structura cuaternară a proteinelor, formă sub care se întîlnesc în structurile celulare.

Biosinteza proteinelor implică transmiterea informaţiei genetice de la molecula de acid nucleic, unde este codificată viitoarea sa structură, la "dispozitivul" celular producător de proteine - ribozomii, în aşa fel încît secvenţa nucleotidelor să se traducă printr-o anumită secvenţă a aminoacizilor în lanţul polipeptidic (Fig. 41).

Ansamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică, determinată, constituie una dintre principalele funcţii ale materialului genetic.

Procesul de biosinteză a proteinelor se desfăşoară în două etape:

a) Transcrierea în ARN_m a informaţiei genetice codificate în ADN, constituie etapa în care informaţia este transpusă într-un limbaj nou reprezentat de semnalele ACGU, ale ARN, deosebit de cel ale ADN care sînt reprezentate prin ACGT. Deosebirea dintre cele două limbaje al ARN şi ADN este dată de prezenţa T în loc de U. Aceasta face să se formeze un ARN traductibil sau mesager (ARN_m) care preia informaţia de la ADN şi o transportă la ribozomi.

b) Traducerea la nivelul ribozomilor a informaţiei genetice purtată de ARN_m, este etapa în care informaţia care a fost transpusă în limbajul de 4 litere al ARN_m, este acum tradusă în limbajul de 20 aminoacizi naturali care intră în structura proteinelor. Ca dicţionar pentru această traducere funcţionează o colecţie de molecule de ARN de transport (ARN_t), molecule capabile să recunoască specific atît un anumit aminoacid, cît şi codonul corespunzător din molecula de ARN_m. Datorită unor particularităţi structurale, ARN_t poate să dispună aminoacizii în locuri specifice de-a lungul moleculei de ARN_m, ceea ce asigură citirea şi traducerea mesajului genetic în secvenţe polipeptidice. Prin dispunerea aminoacizilor secvenţial ia naştere lanţul polipeptidic, a cărei lungime va depinde de secvenţele înregistrate în molecula de ADN.

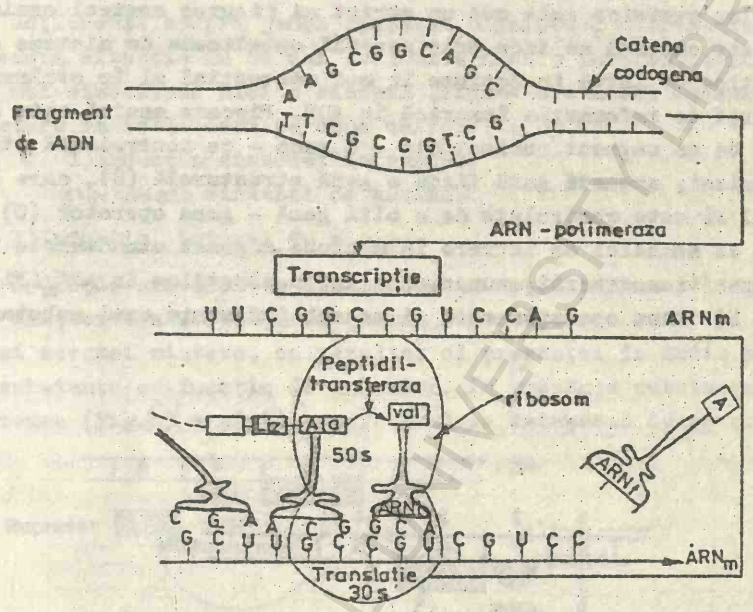


Fig.41. Reprezentarea schematică a procesului de transcriere și translație în biosinteza proteinelor (după, Zarnea, 1980).

5.2.3.1.1. Reglarea biosintezei proteinelor și enzimelor

Biosinteza proteinelor și enzimelor datorită complexității proceselor sale necesită mecanisme și sisteme de reglare prompte. Sînt cunoscute, în prezent, două mecanisme de reglare:

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a)Mecanisme care reglează sinteza proteinelor şi enzimelor (reglarea genetică);

b)Mecanisme care reglează activitatea lor.

a)Mecanisme care reglează sinteza proteinelor şi enzimelor sau reglarea genetică este mecanismul prin care sinteza substanţelor proteice este sub un strict şi riguros control enzimatic. Acest control se face prin reacţii catalizate de sisteme enzimatice ce intră în acţiune în mod secvenţial şi în strînsă dependenţă de informaţia înscrisă în ADN. Fiecare enzimă este dependentă de un segment nucleotidic - o genă - ce controlează structura enzimei, această genă fiind o genă structurală (S), care la rîndul ei este controlată de o altă genă - gena operator (O) care va da semnalul de intrare în acţiune a genei structurale în vederea transcrierii secvenţelor lor nucleotdice în ARN_m(Fig.42 a şi b). Gena operator este şi ea sub influenţa unei substanţe

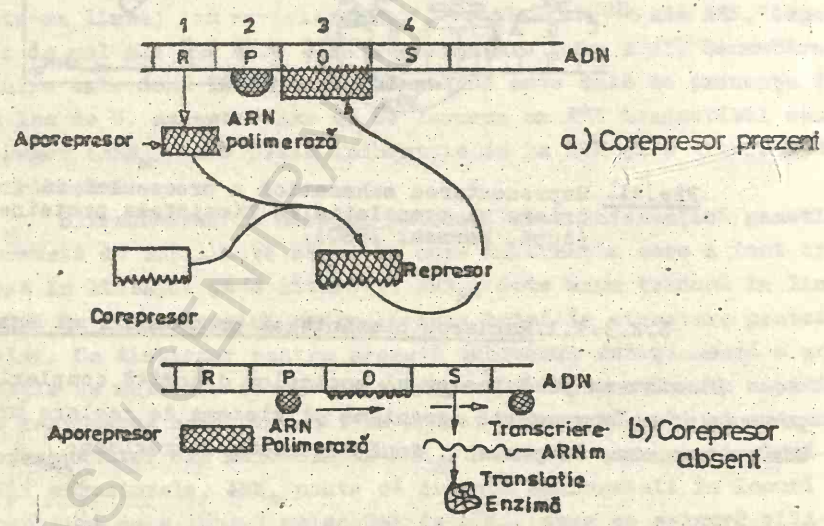


Fig.42. Mecanismul de reglare a sintezei proteinelor şi enzimelor.R=gena reglator;P=gena promotor;O=gena operator; S= gena structurală(după Zarnea, 1980).

citoplasmatice numită represor a cărei sinteză este controlată de gena reglator(R). Represorul, însă, în celulă se găseşte sub formă de două componente: apopresor şi compresor. El este activ numai atunci cînd cele două componente sînt unite. Sub această formă acţionează asupra genei operator blocîndu-i activitatea. In această situaţie nu se mai transmite nici o informaţie şi nu se mai efectuiază nici o sinteză (Fig.42 a). Acest mecanism de reglare se realizează pe două căi:

1)Inducţia sintezei de enzime;

2)Represia sintezei de enzime.

1)Inducţia sintezei de enzime

Inducţia sintezei de enzime sau inducţia enzimatică reprezintă iniţierea sintezei unei enzime sau creşterea relativă a vitezei acestei sinteze, ca rezultat al prezenţei în mediu a unei substanţe cu funcţie de inductor. In prezenţa substanţei inductoare (Fig.43 a şi b), represorul se detaşează de operon

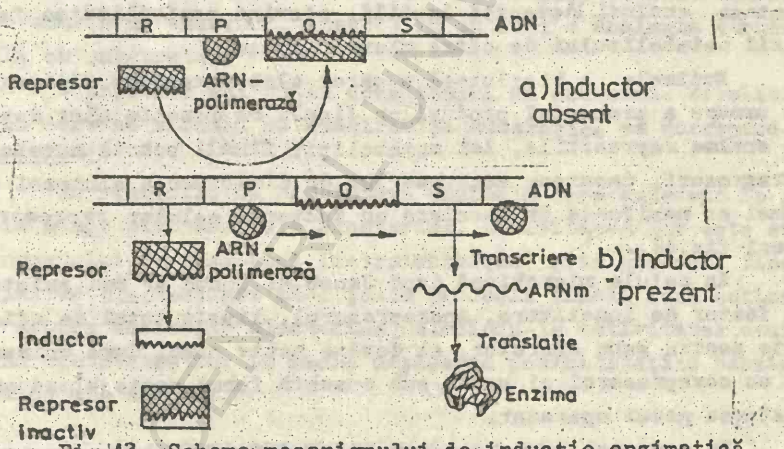


Fig.43. Schema mecanismului de inducţie enzimatică (după Zarnea et.al.,1980).

şi permite ARN - polimerazei să efectueze sinteza ARN_m. Complexul represor - inductor are afinitate de circa 1000 ori mai mică pentru operator decît represorul singur. Unii inductori sînt foarte activi şi pot mări producţia de enzimă inductibilă chiar de 1000 ori, fără a modifica mecanismele celulare de biosinteză.

In practica industrială, se urmăreşte obţinerea de mutanţi fără represori activi sau cu genele operator blocate, eliminîndu-

se în felul acesta creşterea capacităţii de legare a substanţei represor.

2) Represia sintezei de enzime

Represia sintezei de enzime sau represia enzimatică, reprezintă fenomenul de reducere a vitezei de sinteză a unei enzime sau a unui grup de enzime metabolic înrudite sau chiar de stopare a elaborării lor, ca urmare a prezenţei în celulă a unui metabolit represor reprezentat de produsul final al reacţiei de sinteză. Represia enzimatică este deci un fenomen de blocare a sintezei enzimei prin produsul final...acest mecanism de blocare este cunoscut sub numele de feed-back.

In cazul cultivării microorganismelor pe medii complexe, prezenţa fiecărui produs final al unei căi de biosinteză, reprezintă un semnal pentru celulă, care printr-un fenomen de feed-back negativ, adică de represie prin produsul final, opreşte sinteza enzimei devenită inutilă, oferind posibilitatea folosirii metabolitului de către microorganism.

Enzimele de biosinteză a căror elaborare este diminuată ca urmare a prezenţei produşilor finali de reacţie sînt denumite enzime represibile, iar metaboliţii finali poartă numele de corepresori, deoarece acţiunea lor de diminuare a sintezei enzimei se manifestă în asociere cu factorul celular represorul (vezi fig.42).

In celula microbiană după Jacob şi Monod ar mai exista un factor de inactivare, aporepresorul, lipsit total de afinitate pentru gena operator, el devine activ numai după unirea sa cu corepresorul şi numai sub această formă poate bloca manifestarea genei operator.

In momentul în care metabolitul din mediu este consumat represorul care acum nu mai dispune de corepresor cu care să se combine, redevine inactiv, adică aporepresor.

In afară de represia prin produsul final (enzimă) mai există un tip de represie, represia prin catabolit, care este un tip particular de represie enzimatică, ce acţionează asupra unor enzime catabolizante prin blocarea specifică a sintezei lor. Deci, prezenţa în mediu de cultură a două substanţe care pot fi utilizate ca sursă de carbon va face ca microorganismul să utilizeze pe aceea mai uşor accesibilă, inhibînd sinteza

enzimelor implicate în catabolizarea substratului (sursei) care este utilizată mai greu.

Represia prin catabolit al sintezei enzimelor este foarte importantă, deoarece numeroase enzime de interes industrial sînt supuse acestui tip de reglare. Evitarea prezenţei în mediile de cultură a unor surse de carbon sau azot cu rol represor va stimula sinteza enzimelor sensibile la represia prin catabolit.

b)Mecahisme de reglare a activităţii enzimelor.

Sistemele genetice de reglare(inducţia şi represia)sînt eficiente dar numai după o perioadă latentă,mai scurtă sau mai lungă. Celula dispune însă de un mecanism mai prompt şi imediat de reglare numit reglarea alosterică, prin care este controlată sinteza şi activitatea celor mai multe enzime. Enzimele supuse acestui control sînt cunoscute sub numele de enzime alosterice.Toate enzimele alosterice prezintă o serie de caracteristici particulare ce le detaşează net de enzimele inductibile şi represibile şi anume:

- sînt activate sau inhibate de compuşi ce sînt cunoscuţi sub numele de efectori. Aceştia nu au nici o analogie structurală cu substratul;

- prezintă cel puţin două tipuri de situsuri: catalitice prin care se fixează de substrat şi alosterice ce corespund efectorilor .

In reacţiile de biosinteză enzimele care intervin în primele etape sînt enzimele alosterice. Activitatea lor este supusă fenomenului de feed-back (retroinhibiţie) prin produsul final. Rolul de efectori pot să-l joace produşii finali care acţionează asupra enzimelor alosterice, blocîndu-le activitatea atunci cînd cantitatea lor în mediu depăşeşte posibilităţile biosintetice ale celulei.

5.2.3.2. Biosinteza aminoacizilor

Cei mai mulţi aminoacizi folosesc în procesele lor de biosinteză intermediari ai metabolismului general, care sînt produşi în raport de necesităţile microorganismului.

Aminoacizii celulari, în raport cu precursorul de la care pleacă biosinteza, se pot grupa în mai multe familii, excepţie făcînd histidina care prezintă căi de biosinteză particulare (Tabelul 5).

In tabelul 5 sînt prezentate principalele familii de aminoacizi și precursorii lor.

Tabelul 5

FAMILII DE AMINOACIZI LA MICROORGANISME

Familia	Precursorii	Produșii
Glutamatului	alfa-cetoglutarat+ glutamat	Glutamină Arginină Prolină
Aspartatului	oxaloacetat+aspartat	Asparagină Metionină Treonină
		Izoleucină Lizină în parte
Aromaților	fosfoenolpiruvatul+ eritroză-4-fosfatul	Fenilalanină Tirozină în parte Triptofan
Serinei	3-fosfoglicerat-serina.	Glicina Cistina
Piruvatului	piruvat	Alanină Valină Leucină în parte
Histidinei	5-fosforibozil-pirofosfatul + ATP	Histidină

Aminoacizii din familia glutamatului, aspartatului și piruvatului se biosintetizează folosind ca precursori intermediarii ciclului Krebs sau a ciclului glioxilatului, pe cînd cei din familia aminoacizilor aromatici se biosintetizează folosind ca intermediari fosfoenolpiruvatul și eritroză-4-fosfatul, iar cei din familia serinei folosesc ca intermediari 3-fosfoglicerat-serina (Fig.44).

5.2.3.2.1. Biosinteza aminoacizilor din familia glutamatului.

Biosinteza aminoacizilor din familia glutamatului (glutamina, arginina și prolina) o poate realiza toate categoriile de microorganisme care utilizează ciclul HMP și HMP de metabolizare a sursei de carbon cu formare de piruvat. Piruvatul va fi inclus în ciclul Krebs pe parcursul căruia se va forma printre alți produși și alfa - cetoglutaratul care este principalul precursor al aminoacizilor acestei familii (Fig.44 și 45).

5.2.3.2.2. Biosinteza aminoacizilor din familia aspartatului.

Biosinteza aminoacizilor ce aparţin acestei familii au ca iniţiator de biosinteză L-aspartatul (vezi fig.44). L-aspartatul

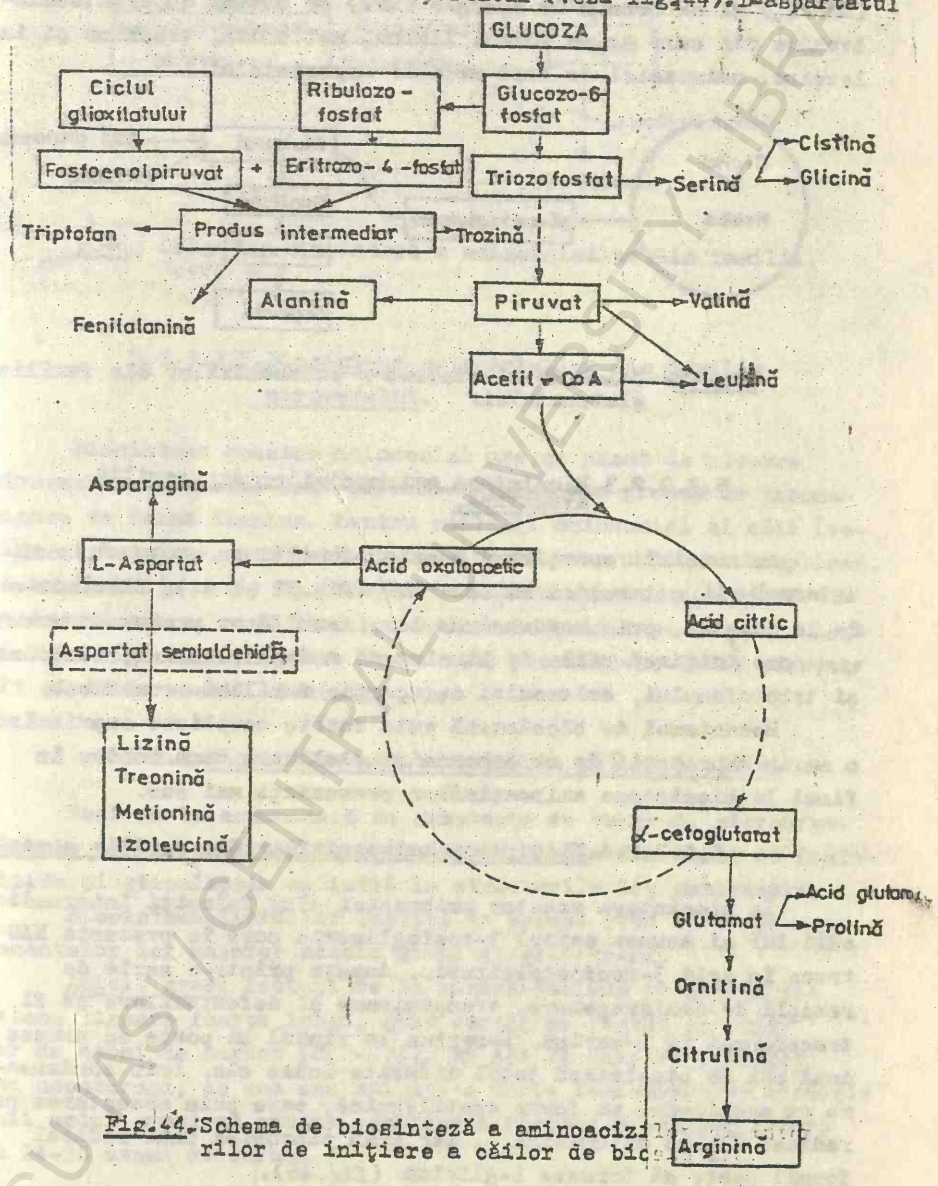


Fig.44. Schema de biosinteză a aminoacizi[lor] rilor de iniţiere a căilor de bio[sinteză]

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

poate să se formeze prin transaminarea acidului oxaloacetic cu formarea de L-aspartat care pe cale enzimatică (cu participarea aspartateaminotransferazei) este transformat în asparagină. Tot pe această cale, dar cu intervenţia altor sisteme enzimatice ($NADPH_2$) şi cu consum de energie (ATP) se obţine aspartatsemialdehida din care se va forma: lizina, metionina, treonina şi izoleucina, aminoacizi de bază ai căii aspartatului.

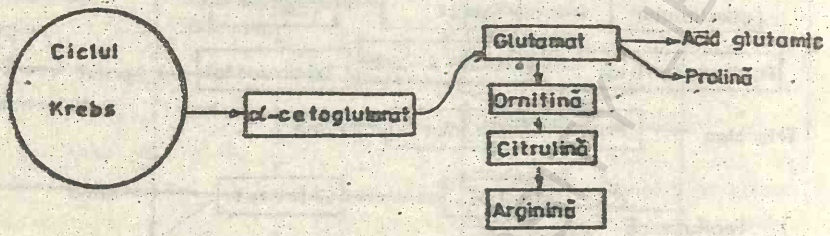


Fig.45. Calea de biosinteză a aminoacizilor din familia glutamatului.

5.2.3.2.3. Biosinteza aminoacizilor din familia aromatică.

Aminoacizii aparţinînd acestei familii au ca precursori intermediari metabolici ai căii HMP (fig.32 şi 44). Plecîndu-se de la aceştea, prin condensarea lor, rezultă un produs intermediar care iniţiază căile de biosinteză a fenilalaninei, tirozinei şi triptofanului, aminoacizi ce aparţin familiei aromatice.

Mecanismul de biosinteză este foarte complicat cuprinzînd o serie de reacţii de condensare şi ciclizare care conduc în final la biosinteza aminoacizilor prezentaţi mai sus.

5.2.3.2.4. Biosinteza aminoacizilor din familia serinei

In biosinteza acestor aminoacizi sînt folosiţi intermediarii căii HMP şi anumea acidul 3-fosfoglicerlc care în prezenţa NAD trece în acid 3-fosfoenolpiruvic. Acesta printr-o serie de reacţii de dehidrogenare, transaminare şi defosforilare va fi transformat în L-serină. L-serina la rîndul ei poate să urmeze două căi de biosinteză total diferite între ele. Prin condensare cu acetil-CoA va forma acetilserina, care prin acceptarea unui radical SH_2 va da cisteina , iar prin pierderea unui radical formil poate să formeze L-glicina (fig.46).

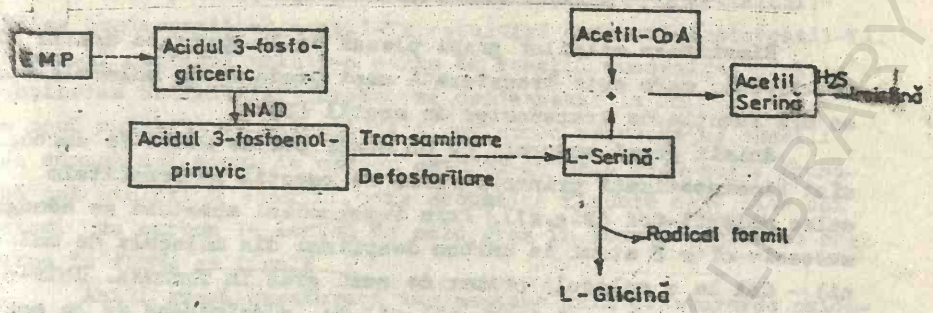


Fig. 46. Calea de biosinteză a aminoacizilor din familia serinei.

5.2.3.2.5. Biosinteza aminoacizilor din familia piruvatului.

Biosinteza acestor aminoacizi are ca punct de plecare piruvatul sau acetil-CoA. Piruvatul printr-un proces de transaminare va forma alanina. Pentru ceilalţi aminoacizi ai căii (valina şi leucina), procesul de biosinteză este mult mai complicat, el implicînd o serie de reacţii de dehidrogenare, condensare şi transaminare, care în final conduc la valină şi leucină. Leucina la rîndul ei se poate forma atît plecîndu-se de la piruvat cît şi de la acetil -CoA(Fig. 44).

5.2.4. Biosinteza substanţelor de natură lipidică

Deşi nu le acumulează ca substanţe de rezervă, microorganismele conţin cantităţi importante de lipide sub formă de fosfolipide şi glicolipide ce intră în structurile lor membranare.

Biosinteza lipidelor implică în primul rînd formarea componentelor lor majore: acizii graşi şi glicerolul.

Acizii graşi izolaţi de la microorganisme au predominat catene lineare foarte lungi, care conţin de regulă un număr par de atomi de carbon (C_{12}-C_{18}). Ei pot fi complet saturaţi sau nesaturaţi, cu una sau mai multe duble legături. Fac excepţie unii acizi graşi cu catenă ramificată (acidul micolipenic)care au 24-30 atomi de carbon.

5.2.4.1. Biosinteza acizilor graşi

Biosinteza acizilor graşi pleacă de la gruparea acetil al acetil-CoA, care este transferată unei proteine cu moleculă mică ce are funcţia de transportor de acetil (TA).

Acizii graşi saturaţi cu un număr par de atomi de carbon sînt biosintetizaţi printr-o serie de reacţii ce constituie calea malonil-CoA (Fig.47). Prin intermediul acesteia se adaugă succesiv cîte 2 atomi de carbon desprinşi din molecula de malonil - CoA la o moleculă primer de acid gras în formare. Intr-o primă etapă are loc sinteza malonil-TA, plecîndu-se de la acetil-CoA printr-o reacţie de carboxilare şi cu consum de energie. In urma acestei reacţii se formează malonil - CoA care va fi

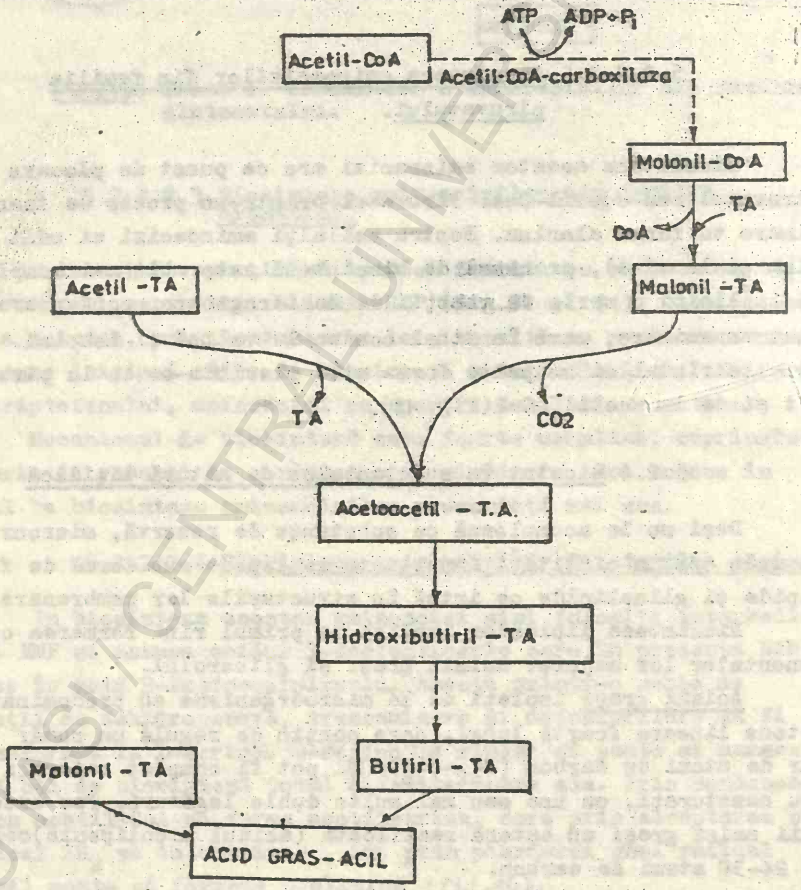


Fig.47. Calea de biosinteză a acizilor graşi.

activată în prezenţa TA punîndu-se în libertate CoA. Malonil-TA se condensează cu acetil-TA rezultînd compusul acetoacetil-TA. Procesul continuă printr-o serie de reacţii succesive, pînă la obţinerea butiril-TA. Acesta se condensează la rîndul său cu o nouă moleculă de malonil-TA şi printr-o secvenţă de reacţii se adaugă doi atomi de carbon catenei de acid gras-acil. Urmează noi cicluri de reacţii, care adaugă de fiecare dată cîte doi atomi de carbon la lanţul de acid gras în formare, pînă se obţine în forma sa finală.

Acizi graşi nesaturaţi iau naştere prin desaturarea oxidativă a acidului gras corespunzător, saturat. Legătura dublă apare între C_9 şi C_{10}, la acizii graşi cu C_{16} şi între C_{11} şi C_{12}, la acizii graşi cu C_{18}.

5.2.4.2. Biosinteza gliceridelor

Deşi microorganismele în general şi bacteriile în particular conţin cantităţi scăzute de gliceride, ele posedă totuşi capacităţi biosintetice prin care sînt produse aceste substanţe. Precursorii de biosinteză a gliceridelor la microorganisme sînt

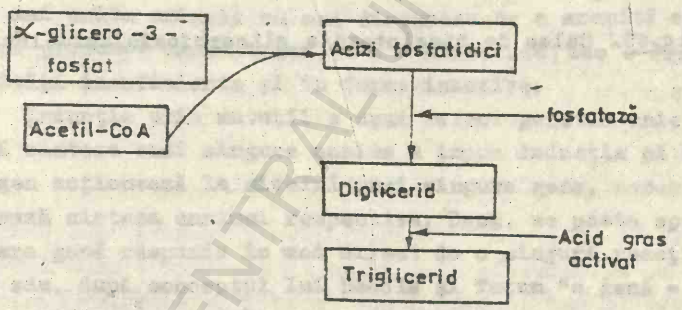


Fig. 48. Calea de biosinteză a gliceridelor.

acizii graşi şi glicerolul-3-fosfat. (Fig. 48).

Intr-o primă etapă are loc condensarea alfa - glicero - 3 - fosfatului cu acetil-CoA cu formare de acizi fosfatidici. Aceştea sub acţiunea unei fosfataze specifice dau naştere unui diglicerid, care prin cuplare cu o nouă moleculă de acid gras activat, va forma un triglicerid.

5.2.4.3. Biosinteza glicerofosfolipidelor

Glicerofosfolipidele au o deosebită importanţă pentru microorganisme, datorită faptului că ele sînt constituienţii membranelor şi transporturi ai lipoproteinelor.

Biosinteza lor are ca punct de plecare acidul fosfatidic (Fig.49) care este convertit în prezenţa citidintrifosfatului (CTP) la citidindifosfat (CDP)-diglicerid, precursor comun al tuturor glicerofosfolipidelor biosintetizate pe această cale.

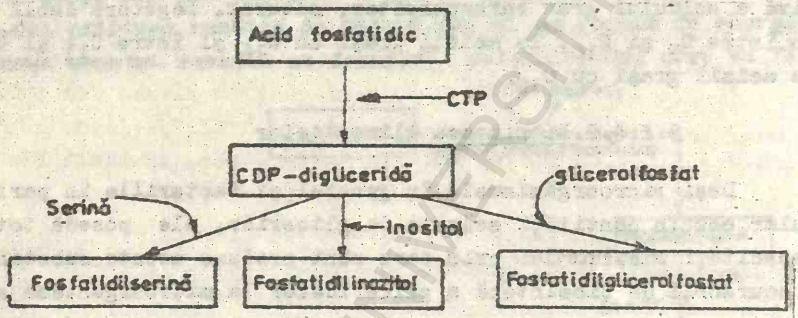


Fig.49. Calea de biosinteză a glicerofosfolipidelor.

CAPITOLUL VI

GENETICA MICROORGANISMELOR DE INTERES INDUSTRIAL

Începînd cu anul 1940 microorganismele devin modele în cercetările de genetică. Iradiind cu ultraviolete (UV) celulele de Neurospora, Beadle, apoi Beadle şi Tatum (1945) au obţinut tulpini mutante care, spre deosebire de tulpinele sălbatice izolate iniţial, nu se mai puteau dezvolta pe medii sintetice cu compoziţie simplă, decît dacă la acestea se adăuga un anumit factor de creştere din categoria aminoacizilor, vitaminelor, purinelor sau pirimidinelor. Peste 95% din mutantele astfel obţinute aveau un defect care le priva de capacitatea de a biosintetiza factorii de creştere necesari propriilor sale sinteze celulare. Studiul activităţii enzimatice a acestor mutante a arătat că, de cele mai multe ori, ele nu mai dispuneau de o anumită enzimă fiindcă îşi pierduse capacitatea de a o sintetiza sau o elabora în cantităţi insuficiente şi în forme inactive.

Inducţia prin mutaţii a unui defect genetic unic care afectează sinteza unei singure enzime a impus deducţia că agentul mutagen acţionează la nivelul unei singure gene, aceea care controlează sinteza enzimei respective. Deci, se poate spune că fiecare genă răspunde în mod direct de o singură reacţie biochimică sau, după conceptul lui Beadle şi Tatum "o genă = o enzimă sau o genă = o proteină". Cercetările ulterioare au arătat că în sinteza unei proteine sau a unei enzime pot fi implicate mai multe gene, fiecare dintre ele controlînd sinteza unei părţi a acestei molecule complexe. Pe baza acestor cercetări formularea iniţială a lui Beadle şi Tatum a fost reformulată sub forma: "o genă = un lanţ polipeptidic".

Identificarea ADN ca principal factor capabil să inducă transformări genetice (Avery şi colab., 1944), apoi descoperirea conjugării la bacterii, descifrarea relaţiei dintre bacteriofag şi celula bacteriană gazdă, etc. au contribuit la lărgirea cunoştinţelor de genetică microbiană, oferind noi posibili-

tăţi de obţinere a unor mutanţi înalt producători pentru industria biotehnologică. De fapt, este cunoscut că cele mai multe microorganisme de interes industrial, cu foarte mici excepţii, sînt forme mutante a unor izolate sălbatice. Numai pe cale genetică s-au putut şi se pot obţine microorganisme de înalt randament şi productivitate.

Segmentul de ADN care controlează anumite caractere morfologice, fiziologice şi biochimice sau care poate fi supus unor modificări în vederea obţinerii de mutaţii este cunoscut sub numele de genă. Gena este deci unitatea funcţională şi structurală a tuturor organismelor.

In genetica microorganismelor, notarea genelor în molecula de ADN cu rol în determinarea anumitor caractere se face prescurtat. De exemplu, gena gal = galactoză, apoi gena arg = arginină, gena lac = lactoză, gena rgh = rough (netedă), etc. Simbolurile gal^+, arg^+, lac^+, rgh^+ indică tipul sălbatic şi capacitatea acestor microorganisme de a folosi galactoza (gal^+) de a sintetiza arginina (arg^+), de a folosi lactoza (lac^+), de a forma colonii cu aspect neted la suprafaţă (rgh^+).

Caracterele alternative (alelice) determinate de tipurile mutante se notează cu, de exemplu, gal^- (incapacitatea de a folosi galactoza), arg^- (incapacitatea de a sintetiza arginina), lac^- (incapacitatea de a folosi lactoza), rgh^- (indică formarea de colonii cu aspect rugos la suprafaţă).

1. Ereditatea microorganismelor

Ereditatea reprezintă totalitatea fenomenelor sau proceselor prin care caracterele şi informaţia genetică a unui individ este transmisă în mod identic altui individ ce aparţine aceleiaşi specii.

Dat fiind faptul că cele două mari categorii de microorganisme procariote şi eucariote se deosebesc între ele din punct de vedere structural şi funcţional, aspectele privind ereditatea lor le departajează şi mai mult, însă, ca de fapt la toate organismele vii, factorii ereditari ai lor sînt tot acizii nucleici. In molecula de acid nucleic este înregistrată întreaga informaţie care dă comportamentul morfologic, fiziologic şi biochimic al microorganismului respectiv.

La toate microorganismele acizii nucleici informaţionali (ADN) alcătuiesc structuri celulare cunoscute sub numele de cromozomi, care la procariote sînt în stare primitivă, puţin organizaţi, pe cînd la eucariote gradul de organizare este mult superior, el redînd treapta de organizare a microorganismului respectiv.

1.1. Rolul genetic al ADN

La toate microorganismele acizii nucleici sînt reprezentaţi prin: acidul ribonucleic (ARN) şi acidul dezoxiribonucleic (ADN). Astăzi este unanim recunoscut că ADN este purtătorul informaţiei genetice, pe cînd ARN are rol de prelucrare şi transmitere a informaţiei genetice de la ADN la structurile celulare.

1.1.1. Structura ADN

ADN este o substanţă macromoleculară, a cărei moleculă este extrem de lungă, foarte subţire şi destul de rigidă, corespunzînd unui polimer format dintr-un număr mare de nucleotide. Fiecare nucleotid este constituit din trei componente (Fig.50):

1. o bază azotată: purinică sau pirimidinică;
2. o moleculă de pentoză;
3. un rest de fosfat anorganic.

-Bazele azotate

Fiecare acid nucleic conţine patru tipuri de nucleotide care se deosebesc între ele după natura bazelor ce intră în compoziţia lor.

Principalele baze azotate ce intră în compoziţia ADN sînt: adinina (A), guanina (G), timina (T) şi citozina (C). ARN conţine şi el tot patru baze azotate, dar în loc de timină conţine uracil (U), celelalte trei fiind identice cu ale ADN-ului.

Adinina şi guanina sînt baze purinice, pe cînd timina şi citozina (şi uracilul în cazul ARN) sînt baze pirimidinice (Fig. 51). Între cele patru baze azotate există deosebiri structurale şi funcţionale ce imprimă caracteristici speciale fiecărui nucleoid. Astfel, bazele purinice adinina şi guanina se deosebesc între ele prin faptul că guanina prezintă în poziţia a 6 în loc

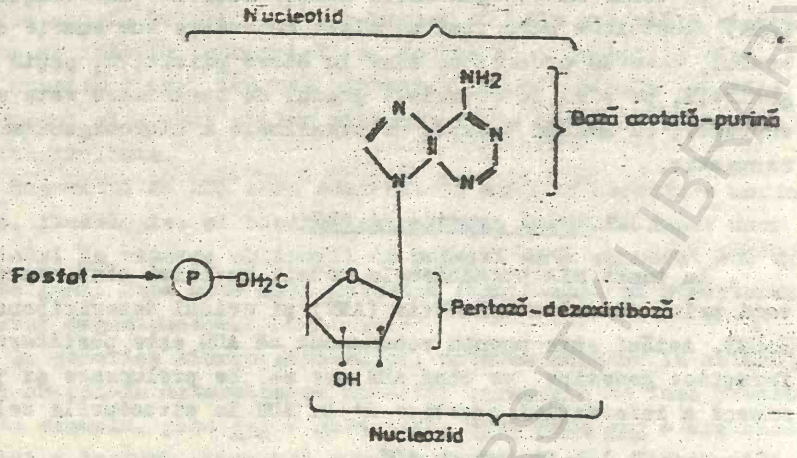


Fig.50. Structura chimică a unui nucleoid (adenozin-5-fosfatul).

de radicalul NH_2 un O_2 dublu legat, iar în poziţia 2 în loc de H_2 are radicalul NH_2.

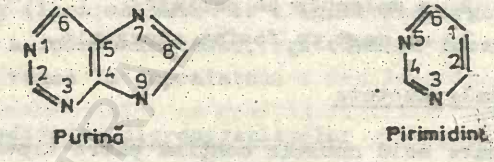


Fig.51. Structura chimică a bazelor azotate.

Bazele azotate pirimidinice: timina şi citozina se deosebesc între ele prin faptul că în poziţia a 6 a timinei în loc de O_2 dublu legat, se află, la citozină, radicalul NH_2. Uracilul se deosebeşte de timină prin faptul că în poziţia 5 în locul grupării CH_3 are un H_2.

- Pentozele

Pentozele sînt reprezentate de dezoxiriboză, în cazul ADN şi de riboză, în cazul ARN (fig.52).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

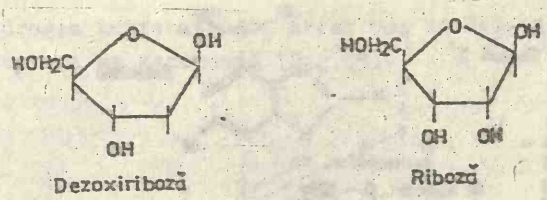


Fig.52. Structura chimică a pentozelor comonente a acizilor nucleici.

Combinarea unei baze azotate cu o moleculă de pentoză duce la formarea unui nucleozid (vezi fig.50).In funcţie de natura pentozei ce intră în molecula acidului nucleic, aceştia se pot identifica ca ARN sau ADN.

-Acidul fosforic este prezent în molecula de acid nucleic sub formă de ortofosfat ce conferă acesteia caracter acid şi numeroase sarcini negative. Datorită lor, acizii nucleici sînt molecule puternic ionizate (Fig. 3).

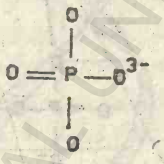


Fig.53. Structura chimică a acidului ortofosforic.

Combinarea structurală a celor trei componente prezentate mai sus alcătuiesc un nucleotid sau mononucleotid(fig.50).Principalele mononucleotide componente ale moleculei de ADN sînt: adenozinmonofosfatul (AMP), guanozinmonofosfatul (GMP), timidinmonofosfatul (TMP) şi citozinmonofosfatul (CMP). Ele sînt dispuse liniar în molecula de ADN formînd gene. O moleculă de ADN poate să conţină un număr variabil de gene, numărul lor fiind specific fiecărui microorganism.

Mononucleotidele se dispun în molecule de ADN într-o ordine bine determinată ce exprimă caracterul ereditar a fiecărui microorganism (Fig.54).

Prin dispunerea în mod secvenţial a mononucleotidelor în molecula de ADN şi prin stabilirea de legături 3' - 5' fosfodiesterice rezultă un lanţ sau o catenă care redă structura primară a sa. Datorită legăturilor fosfodiesterice, mononucleotidele pot forma lungi catene polinucleotidice, neramificate, în care

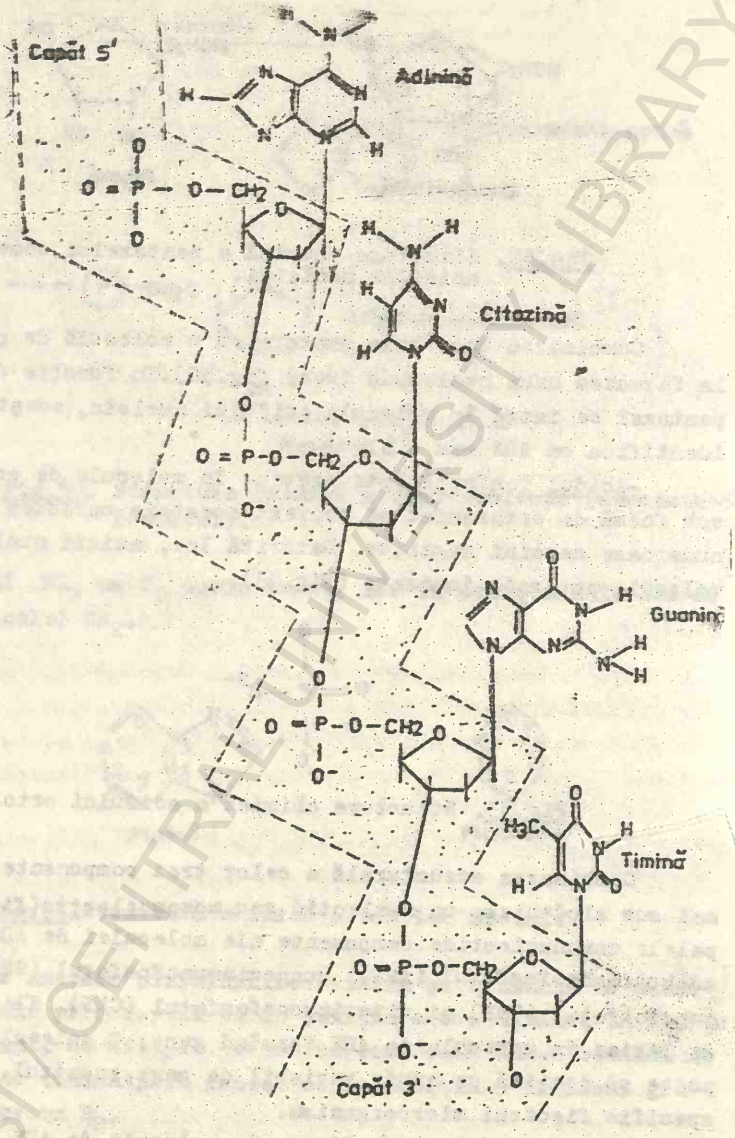


Fig.54. Dispunerea mononucleotidelor în molecula de ADN

succesiunea specifică a celor patru baze azotate (A,T,C,G) asigură codificarea informației genetice. La toate microorganismele ADN prezintă o structură dublu catenară ce rezultă din gruparea a două catene într-o structură helicală (alfa helixul) în care cele două catene se rotesc în jurul axului molecular și stabilesc

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

legături de hidrogen intrecatenar. Acest mod de organizare a ADN reprezintă structura sa secundară (Fig.55)-

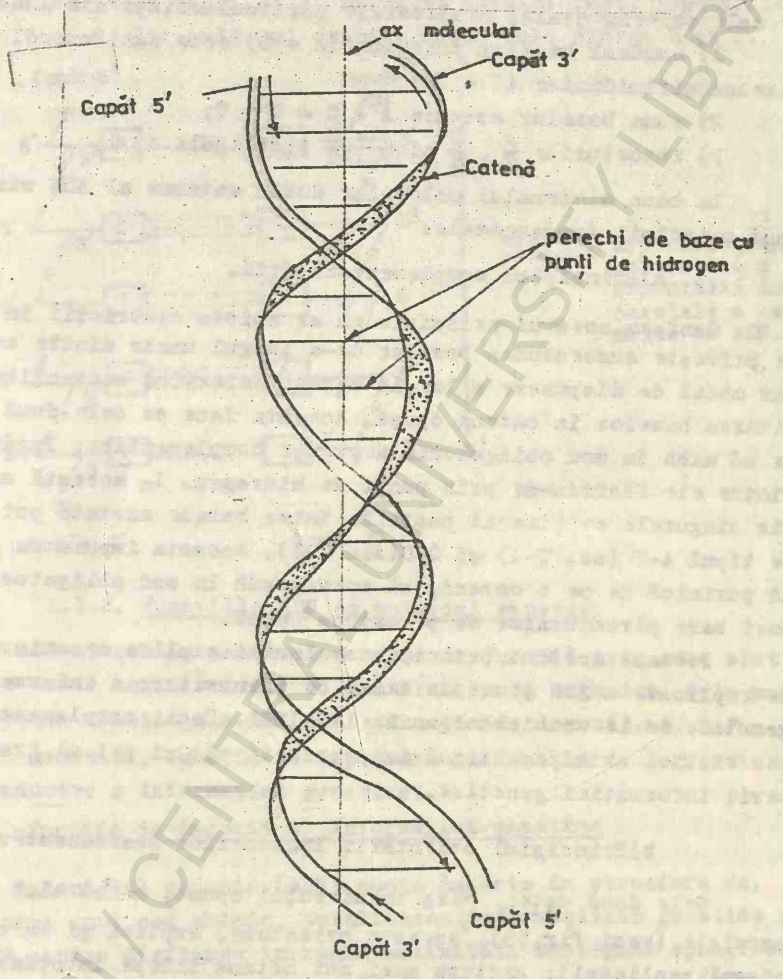


Fig.55. Structura ADN dublu catenară (după Birge, 1981).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura secundară a moleculei de ADN rezultă deci din ansamblarea coaxială a două catene polinucleotidice orientate spre dreapta. Elaborarea acestui model structural aparţine lui Watson şi Crick (1953). Pe baza lui s-a putut pune în evidenţă pe cale experimentală, următoarele particularităţi ale ADN-ului:

1) numărul bazelor purinice (A + G) este egal cu cel al bazelor pirimidinice (C + T);

2) suma bazelor azotate A + C = G + T;

3) raporturile $\frac{A}{T}$, $\frac{G}{C}$ şi $\frac{A+G}{T+C}$ sînt egale cu 1.

La baza sistemului molecular dublu catenar al ADN stau două principii fundamentale:

a)Principiul complementarităţii.

Conform acestui principiu nu ar exista restricţii în ceea ce priveşte succesiunea bazelor de-a lungul uneia dintre catene dar modul de dispunere a lor în catenă determină secvenţionalizarea bazelor în catena opusă. Aceasta face ca cele două catene să aibă în mod obligatoriu secvenţe complementare; legătura dintre ele făcîndu-se prin punţi de hidrogen. În această situaţie singurele combinaţii posibile între bazele azotate pot fi de tipul A-T (sau T-A) şi G-C(sau C-G). Aceasta impune ca o bază purinică de pe o catenă, să corespundă în mod obligatoriu unei baze pirimidinice de pe catena opusă.

Pe baza acestui principiu s-a putut explica mecanismul de replicare a ADN şi capacitatea de transmitere a informaţiei genetice de la un microorganism la altul. Deci, complementaritatea explică atît mecanismul transcrierii cît şi cel al traducerii informaţiei genetice.

b)Principiul orientării legăturilor fosfodiesterice.

Cele două catene merg în direcţii opuse, adică sînt antiparalele (vezi fig.55). Această orientare, explică şi ea mecanismul replicării; sinteza unei noi catene începe întotdeauna de la extremitatea liberă 5' spre extremitatea liberă 3'.

Cele două catene antiparalele au moleculele de dezoxiriboză legate între ele prin legături fosfodiesterice 3'-5'. Bazele azotate de pe cele două catene sînt legate între ele prin punţi de H, iar de molecula de dezoxiriboză prin legături beta-N-glucozil(fig.56).

Legăturile de H dintre baze realizează şi legarea dintre catene de ADN. Numărul de legături de H este diferite în funcţie de bazele între care se realizează. Astfel, între A şi T se stabilesc două legături (punţi) de H, pe cînd între G şi C se stabilesc trei punţi de H. Datorită acestui fapt, legăturile dintre G şi C sînt mult mai stabile decît cele dintre A şi T.

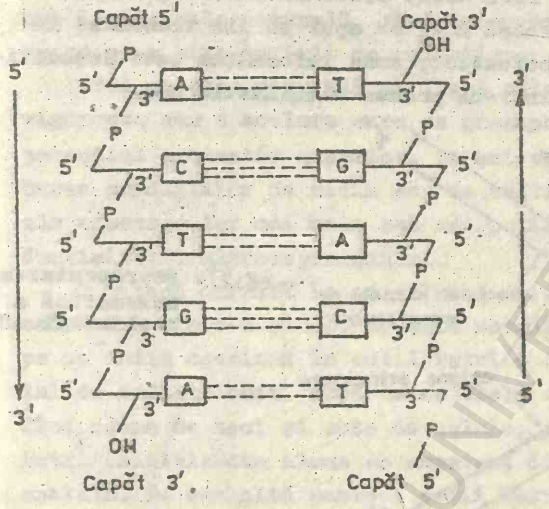


Fig.56. Reprezentarea schematică a orientării antiparalele a catenelor de ADN.

1.1.2. Funcţiile ADN ca material genetic

ADN microbian prezintă o serie de funcţii prin care sînt redate toate manifestările celulare ale unui organism. Cele mai importante funcţii ale ADN sînt: funcţia de depozit al informaţiei genetice, funcţia de replicare şi funcţia de transcriere şi traducere a informaţiei genetice.

-Funcţia de depozit a informaţiei genetice

Materialul genetic (ADN) poate înscrie în structura sa, sub forma unui cod chimic, totalitatea informaţiilor genetice necesare pentru dirijarea întregii activităţi biologice specifică organismului respectiv. Deci, ADN joacă rolul unei matriţi pe baza căreia sînt sintetizate şi structurate toate procesele celulare.

-Funcţia de replicare

Aceasta este una dintre funcţiile esenţiale ale materialului genetic prin care secvenţa bazelor din fiecare catenă a moleculei de ADN eliberată după desfacerea legăturilor intercatenare de hidrogen dictează secvenţa bazelor din catenele

complementare în curs de constituire (Fig.45). Aceasta face ca la celulele fiice transmiterea noului material genetic (ADN) să fie identică cu cel al celulei mame din care a provenit.

-Funcţia de transcriere şi traducere a informaţiei genetice

Această funcţie constă în sinteza unei molecule de ARN_m pe baza matriţei de ADN. Prin acest mecanism informaţia genetică de pe ADN este transmisă ARN_m ca apoi să fie transmisă în citoplasmă la nivelul ribozomilor, unde informaţia este decodificată de ARN_r şi tradusă într-un proces biosintetic nou.

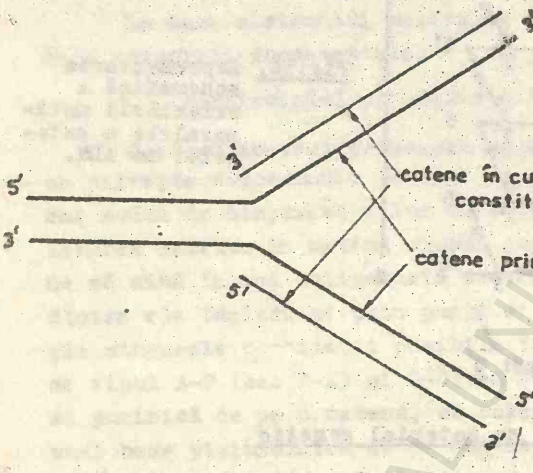


Fig.57. Reprezentarea schematică a replicării ADN.

2.Bazele genetice ale selecţiei microorganismelor.

Dezvoltarea într-un ritm rapid şi susţinut a industriei biotehnologice începînd încă din perioara anilor '50, a impus cu necesitate folosirea unor tehnici de creştere a productivităţii microorganismelor de interes industrial.La început s-a căutat obţinerea unor microorganisme din categoria celor cunoscute care să corespundă mai bine scopului practic. Deci, nu se făcea altceva decît se selecţiona dintre tulpinile existente forme care aveau posibilitatea de a produce substanţe în cantităţi mai mari decît formele curente. Ulterior, s-a trecut la efectuarea de cercetări de mutageneză şi apoi de recombinare genetică care aveau să contribuie la ridicarea productivităţii microorganismelor de mii de ori.

2.1.Selecţia naturală a microorganismelor

Selecţia naturală este acea cale prin care selecţionerul încearcă să obţină dintr-o cultură dată o formă a microorganismului care în diferite condiţii de mediu este mult mai productivă decît oricare dintre formele iniţiale. Cu alte cuvinte, testarea însuşirilor microorganismului selectat din populaţie are loc pe cale naturală, fără intervenţia unor factori dirijaţi cu un scop bine definit de selecţioner.

Tot pe cale naturală pe lîngă selectarea acelor forme mai vigurcase sau a acelora care se presupune că ar prezenta un potenţial productiv superior, se mai poate recurge şi la schimbarea condiţiilor de mediu sau de cultivare, care pot avea şi ele efectele lor mai mult sau mai puţin stimulatorii asupra productivităţii microorganismului.

O metodă curentă în acest sens este metoda redistribuirii celulelor dintr-o clonă. Această metodă constă în însămînţarea pe un mediu agarizat în cutii Petri a celulelor microorganismului de redistribuit. După ce celulele singulare se înmulţesc, dînd clone de zeci şi sute de celule, pe una din jumătatea cutii Petri celulele din clone se amestecă distribuindu-se uniform cu spatula. Pe cealaltă parte a cutii Petri, celulele se lasă intacte. Se incubează, după care se urmăreşte apariţia unor forme noi care se vor studia mai departe,urmărindu-se în mod special productivitatea.

In selecţia naturală a microorganismelor se pot folosi şi alte metode cum ar fi de exemplu, metoda selecţiei indirecte. Această metodă constă în testarea din punct de vedere productiv numai a unor porţiuni din colonie.

Toate metodele de selectare a microorganismelor pe cale naturală, de cele mai multe ori dau rezultate modeste şi nu prezintă reproductibilitatea în procesele de cultivare.

2.2.Selectia artificială a microorganismelor.Mutageneza.

Selecţia artificială a microorganismelor reprezintă totalitatea modificărilor genetice şi biochimice ale unui microorganism sub acţiunea unor factori cunoscuţi sub numele de factori mutageni.

Factorii mutageni produc mutaţii, iar fenomenul este cunoscut sub numele de mutageneză. Mutaţiile pot fi produse atît în plus. cînd caracteristicile microorganismului producător sînt

îmbunătăţite sau în minus, cînd caracteristicile producătorului sînt diminuate.

Factorii mutageni folosiţi în selecţia artificială a microorganismelor pot fi factori fizici, chimici sau biologici.

2.2.1. Factori mutageni fizici

In categoria factorilor mutageni fizici intră în special radiaţiile. Gama radiaţiilor care au efect asupra microorganismelor este destul de largă. Prakker în 1957 le clasifică astfel:

a)Radiaţii neionizante, care generează reacţii fotochimice. In această categorie intră razele ultraviolete (UV).

b)Radiaţii ionizante, care generează reacţii radiochimice. In această categorie intră radiaţiile electromagnetice (Fig.58), cum ar fi razele Röntgen (X) şi razele gama (γ) şi radiaţiile corpusculare, cum ar fi: razele beta (electroni), protinii (nucleii de hidrogen), neutronii lenţi şi rapizi, razele alfa (α) sau nucleii de heliu, şi alte particole grele.

Lungimea de undă (cm)	Tipul de radiaţii
10^{4} 10^{3} 10^{2} 10^{1} 10^{0} (1 cm) 10^{-1} (1 mm)	Radio
10^{-2} 10^{-3}	Infraroşii
10^{-4} (1 μ)	Lumina vizibilă
10^{-5} 10^{-6}	Ultravioletele
10^{-7} (1 mμ)	Radiaţiile X
10^{-8} (1 Å) 10^{-9}	Radiaţiile gama
10^{-10} 10^{-11}	Radiaţiile cosmice

Fig.58. Tipuri de radiaţii şi lungimile lor de undă.

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

-Radiaţiile neionizante. Sînt radiaţiile ultraviolete care fac parte din spectrul solar invizibil, fiind constituite din fotoni cu energie joasă (în jur de 3-5 ergi/m^2) şi cu lungime de undă cuprinsă între 136 Å şi 4000 Å . Acţiunea razelor ultraviolete se exercită prin absorbţia energiei fotonilor cu diferite lungimi de undă de către substratul care intră în stare de excitaţie. Ca urmare a acestei stări au loc reacţii chimice fosforescente şi fluorescente cu formarea de energie care este transmisă altei molecule. Datorită faptului că radiaţiile UV au putere de penetraţie redusă, utilizarea lor în inducerea de mutaţii este recomandată în special pentru microorganisme.

-Radiaţiile ionizante. Atît radiaţiile electromagnetice cît şi cele crepusculare au efecte similare asupra microorganismelor. Ele se exercită ca particole încărcate cu energie diferită. Acţiunea lor se manifestă la nivelul atomilor, unde dezorganizează sferele de electroni care înconjură nucleul atomic.

Se ştie că atomul neutru este într-un echilibru electrostatic , numărul sarcinilor electrice pozitive din nucleul atomic fiind egal cu cel al sarcinilor electrice negative ale electronilor . Radiaţiile electromagnetice avînd o energie şi o viteză foarte mare, întîlnind în drumul lor un atom neutru, sînt capabile să smulgă unul sau mai mulţi electroni de pe orbita exterioară a atomului. Prin pierderea unui electron, atomul rămîne cu o sarcină electrică pozitivă, devenind ion pozitiv sau cation. Electronul eliberat nu rămîne liber, ci se ataşează unui alt atom care, prinde o sarcină electrică negativă, devine ion negativ sau anion. Acest proces poartă numele de ionizare. Deşi ionii produşi în urma iradierii au o viaţă foarte scurtă, de ordinul 10^{-6}s, totuşi ei au mari posibilităţi de a intra într-o serie întreagă de reacţii chimice cu substanţele din compoziţia celulei, în special cu ADN, ducînd la apariţia unor compuşi noi. Dintre radiaţiile electromagnetice cele mai folosite în procese de mutageneză sînt razele gama şi razele Röntgen.

-Razele gama au lungimea de undă cea mai mică 0,005 Å - 1,4 Å, o energie de activare între 1 - 1000 MeV şi nu sînt deviate de cîmpul magnetic. In ultimul timp se utilizează ca sursă de radiaţie gama cobaltul radioactiv (^{60}Co). In acest scop s-au construit aşa numitele cîmpuri gama sau laboratoarele gama, care constau dintr-o sursă de ^{60}Co dispusă central, iar în jurul ei în cercuri concentrice se dispune microorganismul supus ira-

dierii. Sursa de ^{60}Co poate fi manipulată de la distanţă prin introducerea ei într-o tranşee de plumb, ce permite analiza probelor supuse iradierii.

-Razele Röntgen (X) sînt radiaţii electromagnetice cu acţiune asemănătoare razelor gama. Ele au lungimea de undă cuprinsă între 0,06 Å şi 100 Å şi o energie de activare de 0,01 - 0,1 MeV. Puterea lor de penetraţie este mai mică decît a radiaţiilor gama, dar suficient de mare pentru a produce o ionizare puternică.

-Radiaţii corpusculare.

-Radiaţiile alfa (α) sînt formate din nuclei de heliu, fiecare fiind alcătuit din doi protoni. Au putere de penetraţie foarte mică, ce le reduce utilizarea în obţinerea de mutaţii.

-Radiaţiile beta (β), reprezintă un flux de electroni expulzaţi de nucleele atomice cu o viteză de 100.000 - 300.000 Km/s. Ei au o masă mică şi o putere penetrantă de circa 200 ori mai mare ca razele alfa. Ca sursă de raze beta, pentru inducerea de mutaţii se folosesc, în special, izotopii radioactivi ai ^{32}P şi ^{35}S.

-Neutronii sînt particole elementare neutre emise de asemenea în cursul unor reacţii nucleare, în special în reacţiile de dezintegrare a nucleului de uraniu şi plutoniu. In funcţie de energia pe care o posedă nucleii pot fi rapizi (cu energii mai mari de 0,5 MeV), cu viteză medie (cu energii de 0,5 - ? KeV) şi lenţi (cu energii de L KeV - 1 eV). In cazul în care aceştea străbat un microorganism ei se ciocnesc de nucleii atomici ai substanţelor sale componente şi produc două efecte: nucleul lovit de neutron poate începe să emită protoni, ceea ce se întîmplă în cazul iradierii cu neutroni rapizi sau neutronul poate pătrunde în nucleu, fiind captat de acesta, ceea ce se întîmplă în cazul iradierii cu neutroni lenţi. In ambele situaţii iradierea cu neutroni duce la producerea unui număr de particole încărcate electric şi ioni, care generează reacţii chimice noi caracteristice unui material ionizat.

2.2.1.1. Efectele genetice ale radiaţiilor

Radiaţiile ionizate pătrunse într-o celulă afectează în primul rînd cromozomul microbian. La nivelul său au loc modificări structurale, corelate sau nu cu mutaţii genetice. Unul dintre efectele cele mai posibile, sînt ruperile cromozomiale, la diferite nivele ale ADN-ului, care în mod implicit conduc la o

serie de modificări genetice în celula microbiană supusă iradierii. Însă, orice ruptură apărută la nivelul cromozomului microbian, trebuie reparată, pentru aceasta celula posedă o serie de mecanisme care în mod automat intră în funcţiune după apariţia leziunii. Dar, aceste reparaţii conduc la modificări structurale la nivelul ADN şi deci şi la modificări biochimice şi fiziologice.

Lanţul de modificări apărute la o celulă supusă iradierii se pot sintetiza în felul următor: mai întîi radiaţia produce rupturi şi reorganizări la nivelul ADN-ului cromozomial care toate în final conduc la erori în procesele biosintetice ale celulei.

2.2.2. Factori mutageni chimici

In prezent este cunoscută o gamă largă de substanţe chimice capabile să inducă reorganizări cromozomale şi mutaţii .

Spre deosebire de radiaţii, substanţele chimice au un efect specific: produc ruperea şi reorganizarea cromozomului în regiuni paracentrice.

Factorii chimici care produc rupturi şi reorganizări cromozomale pot fi clasificaţi astfel:

a) precursori ai ADN sau analogi ai bazelor azotate;
b) agenţi alkilanţi şi unele antibiotice;
c) alţi factori mutageni chimici.

Pentru ca un agent chimic să aibă efect asupra microorganismului supus procesului de mutageneză trebuie luate următoarele măsuri:

-perioada de tratament trebuie să fie cît mai scurtă;
-doza utilizată trebuie să fie cît mai scăzută; pentru a evita inhibarea diviziunii celulare;
-să se ţină seama de factorii care ar putea afecta efectul agentului (pH, temperatură, etc.).

Factorii chimici cei mai utilizaţi în producerea de mutaţii la microorganisme sînt cei care afectează sinteza şi metabolismul ADN sau ARN.

Preese în 1963 ca şi alţi cercetători au ajuns la concluzia că, probabil, blocarea sintezei unei anumite baze azotate determină apariţia unor eruării în procesul de împerechere normală a nucleotidelor purinici şi pirimidinice în molecule de ADN, fenomen pus în evidenţă ca urmare a apariţiei de aberaţie la nivelul cromozomului şi inducerea de mutanţi (tabelul 6).

Tabelul 6

FACTORI MUTAGENI CARE BLOCHEAZĂ SINTEZA BAZELOR AZOTATE

Factor mutagen	Baza azotat a cărei sinteză este blocată	Microorganismul la care s-a observat mutaţia
1	2	3
5-aminouracilul	Timina	E.coli
Azaserina	Adinină	"
	Guanină	"
Benzimidazolul	Adinină	E.coli
	Guanină	Bacillus subtilis
Cofeina	Adinină	E.coli
	Guanină	Streptomyces
8-etoxicofeina	Timină	Bacillus
	Adinină	E.coli
	Guanină	"
6-mercaptopurina	Adinină	"
	Guanină	
Paraxantina	Adinină	E.coli
	Guanină	
Acid tetrametiluric	Guanină	E.coli
Teobromină	Adinină	E.coli
	Guanină	
Teofilina	Adinină	E.coli
	Guanină	

a) Precursori ai ADN şi analogi ai bazelor azotate

Din această categorie de substanţe fac parte: adinina; dezoxiadenozina, 5-fluordezoxiuridina, 5-bromdezoxiuridina, 5-clordezoxiuridina, 5-iododezoxiuridina, oxipurinele N-metilate (cafeina, teofilina, teobromina, 8-etoxicafeina, 1,3,7,9-acidul tetrametiluric), 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, -bromuracilul, etc.

Toţi aceşti agenţi chimici produc schimbări structurale la nivelul cromozomului, prin modificarea compoziţiei în baze azotate a ADN şi producerea de rupturi cromozomale.

b)Agenţi alchilanţi şi unele antibiotice

Din grupa agenţilor alchilanţi fac parte numeroase substanţe chimice mutagene care au una sau mai multe grupe alchil funcţionale ($-CH_3$; $CH_2 - CH_2-$). In categoria agenţilor alchilanţi cu efect mutagene intră: iperita, dietilsulfatul şi etilmetansulfonatul, epoxizii (2,3-epoxipropiletanul), beta-propiolactona, azaserina. Antibioticele cu efecte mutagene sînt puţin cunoscute. In categoria lor intră doar mitomicina C.

-Modul de acţiune a agenţilor alchilanţi. In general se consideră că ADN este cel mai sensibil la alchilare, cu toate că există mai multe ipoteze privind apariţia aberaţiilor cromozomale sub acţiunea acestor substanţe. Acţiunea substanţelor alchilante se face prin alchilarea atomilor de azot din ADN în următoarea ordine: N 7 de la guanină, N 1 de la adenină, N 1 de la citozină şi N 3 de la adenină. Sub acţiunea agenţilor alchilanţi ADN este denaturat, devenind monocatenar. Fenomenul de alchilare continuă apoi prin separarea bazelor purinice alchilate de lanţul format din zaharuri şi radicali fosforici. Ca urmare are loc ruperea lanţului polinucleotidic al ADN, fapt în concordanţă cu efectul de rupere a cromozomului microbian.

-Reacţii de alchilare la nivelul materialului genetic.

a)Alchilarea grupărilor fosfat din molecula de ADN. Această reacţie împiedică replicarea normală a acizilor nucleici sau duc la apariţia unor eruări în împerecherea bazelor azotate în molecula nou formată.

b)Alchilarea unor baze azotate din macromolecula de ADN. Această reacţie de alchilare poate duce la apariţia unor analogi ai bazelor azotate cum ar fi: 7-metilguanina, 1-metiladenina, 3-metiladenina, 1,3-dimetiladenina, etc.

Alchilarea unor baze azotate are consecinţe importante nu numai din punct de vedere chimic, ci şi din punct de vedere genetic, determinînd modificări ale informaţiei genetice, datorită unor eruări în împerecherea bazelor azotate şi replicarea acizilor nucleici.

c)Depurinizarea macromoleculelor de ADN. Această reacţie se realizează prin alchilarea bazelor purinice şi ruperea legăturilor dintre acestea şi zaharurile alăturate. Rezultatul, este eliminarea unor baze purinice din macromolecula acizilor nucleici şi apariţia fenomenului de mutageneză.

2.2.3. Factori mutageni biologici

In ultimii ani s-a constatat că bacteriofagii pot să producă mutaţii, aceasta deoarece ei pot să-şi interpună ADN lor în molecula de ADN al celulei infectate. Prin acţiunea lor asupra unei celule infectate este posibil să se obţină noi indivizi cu proprietăţi modificate faţă de cele al celulei gazde. Aceşti noi indivizi pot să prezinte modificări în sensul dorit sau nedorit.

2.2.4. Modificarea genetică a microorganismelor sub acţiunea factorilor mutageni.

Sub acţiunea factorilor mutageni microorganismele pot recepta mai multe tipuri de modificări genetice. Pînă în prezent se cunosc următoarele tipuri de modificări care toate conduc la apariţia de mutaţii:

1) Substituţia;
2) Inserţia sau adiţia;
3) Deleţia sau suprimarea;
4) Inversia secvenţelor.

1)Substituţia sau înlocuirea unei anumite baze se poate realiza pe două căi:

a) prin tranziţie, aceasta are loc atunci cînd se substituie o pirimidină cu o altă pirimidină, sau o purină cu o altă purină;

b) prin transversie, cînd are loc înlocuirea unei pirimidine cu o purină sau a unei purine cu o pirimidină. Ca urmare a acestor înlocuiri pot să apară mutaţii cu sens fals sau mutaţii non sens.

2)Inserţia sau adiţia reprezintă adăugarea unei baze suplimentare la secvenţa originală.

3)Deleţia sau suprimarea are loc atunci cînd se omit o bază azotată la constituirea unei secvenţe nucleotidice. Aceasta are ca efect defazarea citirii mesajului genetic şi eruări în transcrierea informaţiei genetice. Este ştiut că în timpul sintezei proteinelor mesajul genetic este citit şi tradus sub formă de grupări de trei nucleotide (triplet - codon) care se succed unele după altele, fără punctuaţie, începînd de la un semnal start secvenţial pînă la un semnal stop. Inserţia sau adiţia unui nucleotit are ca rezultat o schimbare în succesiunea nucleotidelor

şi a codonilor şi deci apariţia eruării de citire.

4)Inversia este modificarea genetică care constă în aceea că un număr de baze dintr-un mic segment al catenei de ADN îşi schimbă ordinea în cursul copierii, dispunîndu-se într-o succesiune inversă decît cea originală.

2.2.5. Tipuri de mutaţii la microorganisme

La microorganisme sînt cunoscute mai multe tipuri de mutaţii. Clasificarea lor se face după mai multe criterii care nu se exclud reciproc:

A) După modul de apariţie mutaţiile pot fi:

1)Mutaţii spontane. Acestea apar în natură datorită unor cauze necunoscute, în condiţii de mediu obişnuite şi fără intervenţia unor factori mutageni specifici.

2)Mutaţii induse. Sînt produse sub acţiunea unor factori mutageni fizici, chimici sau biologici.

B)După mărimea segmentului genetic alterat mutaţiile pot fi:

1)Mutaţii punctiforme. Sînt acelea mutaţii care rezultă prin alterarea structurii unui singur nucleotid sau a unui singur codon .

2)Mutaţii extinse. Aceste mutaţii apar ca urmare a acţiunii factorului mutagen asupra mai multor nucleotide sau codoni afectînd activitatea unei singure gene (mutaţii genice) sau a mai multor gene (mutaţii poligenice).

C) După sensul modificării în raport cu mesajul genetic iniţial mutaţiile pot fi:

1) Mutaţii înainte. Toate aceste mutaţii schimbă mesajul genetic iniţial a formei sălbatice a microorganismului, ducînd la apariţia unei forme mutante (mutantul propriu-zis).

2) Mutaţii înapoi. Sînt cunoscute şi sub numele de retromutaţii sau mutaţii inverse, care fac ca un microorganism mutant să redevină la forma sa sălbatică, iniţială.

3) Mutaţii supresor. Acestea sînt mutaţiile care apar la tulpinile care au suportat o mutaţie anterioară. Cea de a doua mutaţie, mutaţia supresor afectează o genă diferită de cea modificată iniţial şi are drept efect corijarea efectului mutaţiei iniţiale.

D) După modul de exprimare fenotipică mutaţiile pot fi:

1) Mutaţii perceptibile. În această categorie intră mutaţiile care se manifestă prin diferite grade în schimbarea însuşirilor fenotipice a microorganismului mutant (dimensiuni, formă, culoare, funcţii fiziologice, aspecte microscopice etc.).

2) Mutaţii imperceptibile, sînt mutaţiile la care caracterul genotipic mutant nu se exprimă fenotipic, el constînd doar în modificări genetuce celulare.

3) Mutaţii letale. La aceste microorganisme mutante, alterarea mesajului genetic are un efect mortal pentru ele. Acest efect se poate manifesta prin pierderea unei enzime esenţiale pentru viabilitatea şi reproducerea celulei.

4) Mutaţii condiţionat-letale. Sînt mutaţiile la care caracterul letal se exprimă numai în anumite condiţii de mediu, numite nepermisive, deoarece nu permit dezvoltarea normală a celulei.

2.2.6. Rata de apariţie şi frecvenţa mutaţiilor

- Rata de apariţie a unei mutaţii

Reprezintă probabilitatea medie ca un microorganism să sufere o mutaţie, într-o unitate definită de timp, ce în mod obişnuit este egală cu timpul de generaţie. La bacterii rata de apariţie a unei mutaţii este în medie de 1×10^{-9}, aceasta înseamnă că atunci cînd totalul indivizilor dintr-o generaţie este de 10^9, în medie unul dintre aceştia poate să devină mutant. Ca urmare, cu cît celulele dintr-o coloană sînt în număr cît mai mic, probabilitatea apariţiei unei mutaţii este mic, iar populaţia poate fi consideratâ omogenă. Însă creşterea numărului de indivizi din coloană duce la creşterea ratei de apariţie a mutaţiilor, populaţia devenind eterogenă. Mai mult decît atît în una şi aceeaşi populaţie microbiană se pot acumula mutaţii succesive, crescînd şi mai mult eterogenitatea culturii. De exemplu, o populaţie microbiană cu caractere originale prototofe (P) sensibilă la streptomicină (S^s) şi sensibilă şi la acţiunea fagilor (F^s) poate deveni, prin mutaţie o tulpină autotrofă (A), rezistentă la streptomicină (S^r) şi acţiunea fagică (F^r). Datorită mutaţiei suferite, celulele rezultate sînt mai bine adaptate la condiţiile de mediu, ele se multiplică mai rapid decît formele parientale şi, ca urmare, descendenţii lor vor creşte numeric, iar complexitatea fenotipică şi genotipică a întregii populaţii se va amplifica.

- Frecvenţa mutaţiilor este un indicator a cărei valoare se obţine raportînd numărul de celule mutante prezente la un moment dat, la numărul total de celule din populaţia respectivă. Valoarea acestui indicator, depinde, pe de o parte, de acţiunea favorizantă sau defavorizontă exercitată asupra multiplicării mutantelor de către acei factori în raport cu care mutaţia dată reprezintă pentru celulă un avantaj sau, dimpotrivă, un dezavantaj.

3. Mecanisme de transfer genetic la microorganisme

Microorganismele prezintă o serie de mecanisme prin care un fragment de ADN poate fi transferat de la o celulă la alta.

Transferul de ADN la microorganisme reprezintă totalitatea mecanismelor prin care moleculele informaţionale treo de la o celulă la alta. Celula care eliberează ADN informaţional este cunoscută sub numele de donor, iar celula care o primeşte este cunoscută sub numele de receptor.

Introducerea (transferul) prin membrană a ADN într-o celulă, implică o gamă largă de interacţiuni între o serie de constituenţi de natură proteică ce aparţin celulei donoare (placa bazală a fagilor, pilii de sex, etc.) şi celulei receptoare.

Transferul de material genetic la microorganisme implică fie transferul de informaţie genetică cromozomală (ADN cromozomal), fie de informaţie fagică (ADN fagic) sau plasmidială. Acest transfer se poate realiza prin următoarele mecanisme: transformare, traducţie, conjugare şi sexducţie.

3.1. Transformarea genetică

Transformarea genetică este mecanismul de transfer a informaţiei genetice cromozomale de la o celulă donoare, care îl eliberează datorită unor factori chimici sau prin liză, la o celulă receptoare competentă. Odată pătruns în celula receptoare fragmentul de ADN poate înlocui printr-un proces de recombinare genetică o secvenţă nucleotidică, în felul acesta imprimîndu-i-se noi proprietăţi celulei receptoare.

Datorită mecanismului de transformare anumite tulpini, în special de bacterii, crescute în prezenţa unor celule omorîte sau lizate pot să dobîndească în generaţia următoare noi caractere date de fragmentele de ADN a celulelor distruse.

Fenomenul de transformare a fost descoperit în anul 1928 de către Griffith , dar natura agentului transformat a fost demon-

stratã abia în anul 1944 de cãtre Avery, Mac Leod şi Mc Carty, care au arãtat cã aceasta este reprezentat de un fragment de ADN pur, cu grad înalt de polimerizare. Tot ei au mai arãtat cã, capacitatea ADN celulei donare de a pãtrunde în celulele receptoare este determinatã de cel puţin douã proprietãţi ale sale: 1) structura dublu catenarã şi 2) mãrimea moleculei.

Molecula de ADN dublu catenarã are o activitate transformatã maximã, pe cînd molecula de ADN monocatenar are o activitate transformatã foarte micã sau uneori nulã.

Moleculele de ADN cu greutate molecularã mare au dau transformãri genetice. Rezultatele cele mai bune se obţin cu fragmente de ADN cu o greutate molecularã de aproximativ $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ d.

Frecvenţa procesului de transformare este influenţatã şi de concentraţia ADN din mediu de transformare. Dupã Brock (1974) concentraţia minimã de ADN care poate produce o transformare genetic detectabilã este de aproximativ 1×10^{-5} µg/ml. Numãrul celulelor transformate creşte proporţional cu concentraţia ADN din mediul de transformare.

Transformarea este posibilã numai dacã microorganismul receptor prezintã o stare specialã de competenţã, care le permite interacţiunea cu fragmentul de ADN exogen, facilitînd înglobarea sa ireversibilã. Aceastã stare de competenţã creşte foarte mult în faza exponenţialã a creşterii, cînd rata de creştere este maximã. In acest moment se poate presupune cã toate celulele sînt apte sã înglobeze ADN exogen.

3.1.1. Fazele mecanismului de transformare

Mecanismul de transformare genetic evoluiazã în mai multe faze succesive (fig.59).

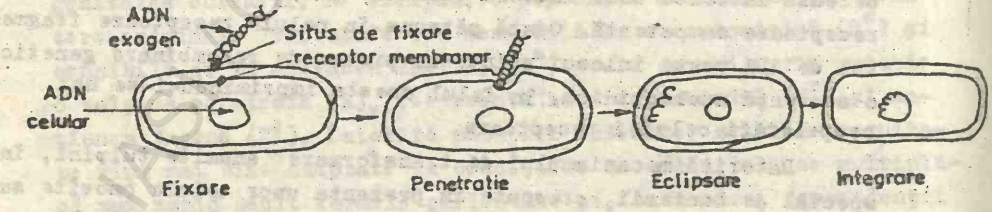


Fig.59. Reprezentarea schematicã a procesului de transformare.

1) Faza de fixare şi penetrare intracelulară

In această fază ADN exogen este legat reversibil, prin intermediul unor situsuri receptoare de celula competentă. Intr-un moment imediat următor are loc fixarea ireversibilă, în cursul căreia, probabil ADN exogen nu mai este extracelular, ci se găseşte cel puţin parţial periplasmatic, fapt care ar explica rezistenţa sa la hidroliza enzimatică cu ADN-ază. Legătura ireversibilă necesită consum de energie, de aceea nu se realizează la microorganismele care au metabolism energetic inhibant. Datorită acestui fapt în absenţa glucozei are loc numai o fixare labilă a ADN, în timp ce în prezenţa ei, majoritatea moleculelor se leagă solid de membrana citoplasmatică. Deşi peretele celular are rol de barieră, el poate să joace şi un rol important în fixarea moleculei de ADN pe suprafaţa celulei. Dovada o constituie faptul că protoplaştii leagă foarte slab ADN transformat.

Imediat după traversarea învelişurilor celulare a celulei receptoare, sau imediat după pătrunderea în celulă, ADN exogen dublu catenar devine monocatenar. Transformarea sa se face sub acţiunea unei endonucleaze localizată la nivelul membranei celulare.

2) Faza evenimentelor celulare

Imediat după pătrunderea ADN exogen în celula receptoare, au loc o serie de fenomene celulare pe parcursul cărora nu se manifestă nici o activitate transformată. Această fază mai este cunoscută şi sub numele de faza de eclipsare. Ea durează aproximativ 1-5 min. Pe parcursul ei ADN exogen este convertit de la forma sa dublu catenară la forma monocatenară.

3) Faza de integrare a ADN şi de recombinare genetică

ADN monocatenar transformat, după o perioadă relativ scurtă de eclipsare se integrează în structura ADN celular, care joacă rol de receptor. Procesul se realizează prin substituirea unui segment dintr-o catenă a ADN receptor şi integrarea ADN monocatenar transformant. Iniţial are loc o recunoaştere a regiunii de integrare de către ADN transformant (exogen), urmată de legarea celor două molecule prin formarea de legături complementare între baze. După realizarea acestor joncţiuni, intră în functie o serie de sisteme reparatorii care corectează eventualele imperfecţiuni de legare.

Frecvenţa maximă a transformărilor genetice, în condiţii de saturare cu ADN, poate atinge 10 % din indivizii unei specii componente.

3.2. Transducţia

Transducţia este mecanismul de transfer al unui fragment de material genetic de la un microorganism la altul, prin intermediul unui fag temperat. Datorită acestui fapt transducţia mai este cunoscută şi sub numele de transducţie fagică.

Fenomenul de transducţie este în mod predominant întîlnit la bacteriile ce posedă receptori fagici specifici.

Transducţia este un proces anormal, deoarece transferul genelor bacteriene este realizat prin intermediul unei structuri, capsida fagică, care a evoluat pentru a proteja şi transporta genomul viral ce poartă informaţia genetică specifică fagului.

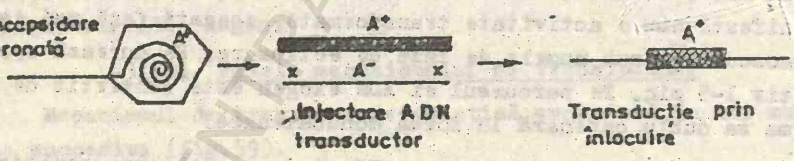
In funcţie de structura genetică a fagilor transductori au fost descrise două tipuri de transducţii (fig.60).

1) Transducţia specializată;

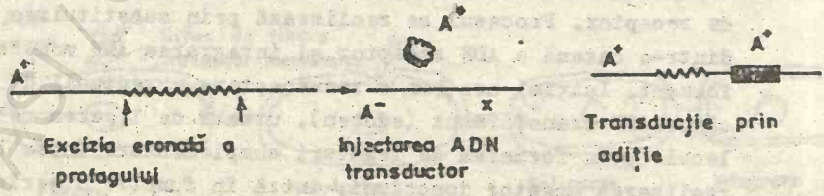
2) Transducţia generalizată.

1) Transductia specializată

Este cunoscută şi sub denumirea de transducţie fagică restrictivă sau localizată. Ea este caracteristică unor fagi transductori cum ar fi fagul λ şi ϕ 80. Aceşti fagi au proprietatea de a transfera eficient numai un număr restrîns de gene bacteriene, situate în imediata apropiere a situsului de legare a fagu-



a) TRANSDUCŢIE GENERALIZATĂ



b) TRANSDUCŢIE SPECIALIZATĂ

Fig.60. Reprezentarea schematică a mecanismului de transducţie fagică. a) generalizată; b) specializată (după Echdls, 1977).

lui. Genomul lor este format dintr-un ADN dublu catenar. Acest ADN , prin intermediul fagului , se fixează de celula gazdă pe care o liza , dar prin intermediul unor receptori este captat în interiorul ei, unde vor avea loc alte procese specifice. De exemplu, fagul lambda (λ) este injectat în celula E.coli după o scurtă perioadă de fixare pe o structură membrană specializată în transportul maltozei. După injecţie, ADN fagic trece, de la forma liniară, la forma circulară, după care urmează integrarea sa în ADN bacterian (fig.61). In cele din urmă ei produc liza

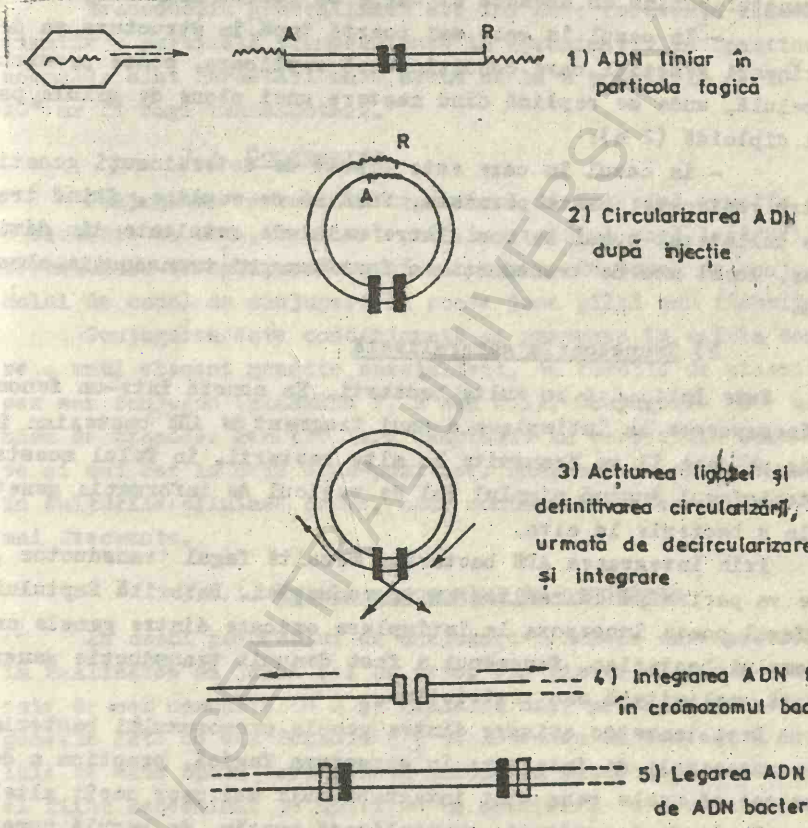


Fig.61. Reprezentarea schematică a integrării ADN fagic în ADN bacterian al celulei receptoare.

celulei gazde, cu eliberarea ADN recombinat.

Integrarea este favorizată de faptul că, atît genomul fagic, cît şi cromozomul bacterian posedă situsuri de legare specifice.

Integrarea este rezultatul unei recombinări genetice de tip special, numită recombinare integrativă sau recombinare la situsuri specifici.

In unele cazuri, datorită caracterului său străin, ADN fagic (exogenotul) este recunoscut de sistemele enzimatice celulare şi degradate. Degradarea sa se face cu enzime specifice din categoria endonucleazelor de restricţie.

Pot să existe şi situaţii în care integrarea nu are loc, exogenotul putînd în această situaţie să urmeze două căi:

- în cazul în care mai poartă încă în structura sa determinanţi genetici care condiţionează replicare, poate persista în celulă, unde se replică dînd naştere unei clone de celule parţial diploidă (2 n);

- în cazul în care este lipsit de determinanţi genetici pentru replicare, poate persista, fără să se replice, fiind transmis unilateral numai la una dintre celulele rezultate din diviziune. Acest mod de transducţie a fost denumită transducţie absorbtivă.

2) Transducţia generalizată

Este întîlnită la multe bacterii. Ea constă într-un fenomen de încorporare la întîmplare a unui fragment de ADN bacterian în ADN fagic pe care îl va transmite la alte bacterii, în felul acesta bacteriofagul jucînd simplul rol de vehicul de informaţie genetică de la o bacterie la alta.

Prin integrarea ADN bacterian rezultă fagul transductor , care va participa la realizarea transducţiei. Datorită faptului că fagul poate încorpora la întîmplare oricare dintre genele cromozomului bacterian, fenomenul a fost denumit transducţie generalizată, nelimitată sau restrictivă.

Deşi teoretic oricare dintre genele cromozomului bacterian are şanse egale de integrare în structura fagică, practica a demonstrat că unele gene sînt integrate mult mai uşor decît altele.

Fagii de transducţie generalizată conţin, de regulă numai gene de provenienţă bacteriană şi numai excepţional mici fragmente de genom viral libere.

Mărimea fragmentului de ADN cromozomal încorporat în ADN fagic este proporţională cu dimensiunile acestuia.

Fenomenul de transducţie fagică generalizată se desfăşoară în felul următor:

Intr-o primă etapă are loc infecţia bacteriană care este urmată de circularizarea ADN printr-un proces de recombinare şi formare de ADN catenar transductor. Insă nu toţi fagii au proprietatea de a lega ADN bacterian, ci numai unii care conţin în structura lor ADN bacterian. Aceştia vor produce transducţia. Ceilalţi fagi se vor multiplica şi vor determina liza celulei cu eliberarea lor şi a celor transductori. Aceştia din urmă vor transmite genele legate altor bacterii desăvîrşind procesul de transducţie.

Transducţia generalizată are loc cu o frecvenţă redusă. Aproximativ o particolă transductoare la aproximativ 10^5 particole normale. Sînt cercetări care arată că la o populaţie de 10^9 fagi, 10^4 ar fi fagi transductori.

3.3. Conjugarea

Conjugarea reprezintă transferul de material genetic de la o bacterie la alta, realizat prin intermediul unei legături intercelulare directe, cunoscută sub numele de canal de conjugare. Rolul de canal de conjugare îl poate juca pilii sau fimbrii.

Conjugarea este condiţionată de prezenţa în celula donatoare a unui element genetic specializat, cu funcţie de plasmidă de sex sau conjugon (plasmida F, R sau Col). Conjugarea este un mecanism de transfer genetic larg răspîndit la bacteriile Gram-negative şi mai rar la cele Gram-pozitive. Răspîndirea sa este mai mare în culturile celulare dense, unde contactele intercelulare sînt mai frecvente.

3.3.1. Fazele procesului de conjugare

In cazul procesului de conjugare celulele care participă la realizarea sa joacă rol de sexe. Una dintre ele, cea donoare este de sex masculin (♂) şi cealaltă care primeşte materialul genetic este de sex feminin (♀). Intrarea în contact a două celule de sexe opuse reprezintă iniţierea procesului de conjugare, el fiind determinat de apariţia în celulele ♀ a unui antigen de suprafaţă care scade încărcătura negativă a suprafeţei şi prin aceasta favorizează contactul intim şi aderarea specifică dintre ele.

In raport de prezenţa plasmidelor de sex sau a pililor şi flagelilor, principalele faze ale procesului de conjugare decurge după cum urmează:

a) In cazul în care două celule cu pasmide de sex intră

în contact şi sînt de sexe diferite, între ele apare o incizie sau breşă, ADN plasmidial sub acţiunea unei endonucleaze se va cliva în două molecule de ADN monocatenar, una dintre acestea va fi transferată în celula receptoare, iar cealaltă rămîne în celula donoare, aici îşi va sintetiza o nouă catenă complementară, refăcînd plasmida. Catena ADN transmisă celulei receptoare serveşte ca matriţă pentru sinteza unei noi plasmide sau poate intra într-un proces de recombinare cu ADN celulei receptoare (fig.62).

Întrucît transferul are loc cu o eficienţă mare, caracterul masculin se răspîndeşte rapid în cultura bacteriană, aceasta conducînd în final la masculinizarea culturii.

b) În cazul cînd celulele prezintă pili sau fimbrii, procesul de conjugare se realizează prin intermediul acestora. Conform unor cercetări mai recente (Achtman, 1978) pilii de sex ar fi necesari numai în faza iniţială în care se face legătura dintre celule, în vederea transferului de material genetic. După introducerea materialului genetic (ADN) în celula receptoare aceasta va parcurge în continuare aceleaşi etape ca în cazul „a".

Materialul genetic nou adus în celula receptoare prin conjugare şi inclus în cromozomul său bacterian va imprima acesteia noi caractere care se vor transmite în descendenţi.

Durata procesului de conjugare este diferit de la specie la specie. Pentru bacteriile care au timpul de generaţie de 20-30 min., durata procesului de conjugare este de 4 ori mai mare decît aceasta.

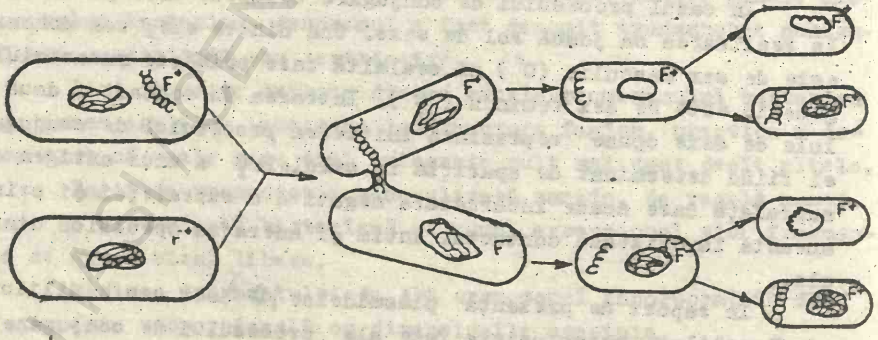


Fig.62. Reprezentarea procesului de conjugare la bacterii.

3.4. Sexducţia

Transferul de gene cromozomale mediat de plasmide de sex este cunoscut sub numele de sexducţie. Tipul cel mai studiat, este cel mediat de plasmida F, fapt pentru care a mai fost denumit şi F-ducţie.

In anul 1965 Broda şi Scaife au adus primele probe genetice, incontestabile privind încorporarea genelor cromozomale în plasmida F. La unele bacterii, în special la cele cu înaltă frecvenţă de recombinare, plasmida F rămîne în mod obişnuit integrată în cromozomul bacterian, din care vor rezulta prin diviziune noi celule cu înaltă frecvenţă de recombinare (Hfr). Ocazional, însă tulpinile Hfr au tendinţa să revină la starea F^+ prin reversia plasmidei F, de la starea integrată în cromozomul bacterian, la starea autonomă în citoplasmă, printr-un proces invers celui de integrare. In această situaţie are loc o excizie a ADN plasmidial şi un schimb de material genetic între plasmidă şi cromozomul bacterian. Aceasta face ca plasmida să încorporeze una sau mai multe gene cromozomale care prin procese de replicare vor fi transmise la alte celule receptoare.

3.5. Recombinarea genetică

Recombinarea genetică este procesul prin care materialul genetic provenit din două genomuri diferite se constituie într-un genom calitativ nou, purtător al informaţiei genetice a ambilor indivizi de la care a provenit. Prin acest proces un segment de ADN cromozomul este înlocuit cu un segment analog, transmis prin conjugare, transformare, transducţie sau sexducţie. Ca urmare a acestui proces informaţia genetică a celulei receptoare se modifică datorită aportului de informaţie genetică nouă.

O parte din materialul genetic transmis celulei receptoare este posibil să nu fie integrat prin recombinare, în această situaţie el este degradat pe cale enzimatică, produşii rezultaţi fiind folosiţi ca metaboliţi celulari.

La nivel molecular recombinarea genetică este echivalentă cu schimbul de secvenţe nucleotidice între regiuni omologe de pe celula endogenă de ADN şi fragmentul de ADN exogen.

3.5.1. Mecanismul recombinării genetice

Datorită faptului că mecanismul intim al procesului de recombinare este încă necunoscut, prezentarea unor ipoteze mai

plauzibile nu este lipsit de interes.

- Ipoteza „rupere - reunire". Conform acestei ipoteze recombinarea ar fi inițiată prin ruperea celor doi cromozomi alăturați aproximativ la același nivel pe ambele molecule de ADN. Fragmentele de ADN astfel rezultate se reunesc apoi încrucișat astfel încît cromozomii recombinați (catenele de ADN recombinat) provin direct din cei doi cromozomi parentali. Fragmentele de ADN neintegrate în cromozomul recombinat sînt degradate pe cale enzimatică (fig.63).

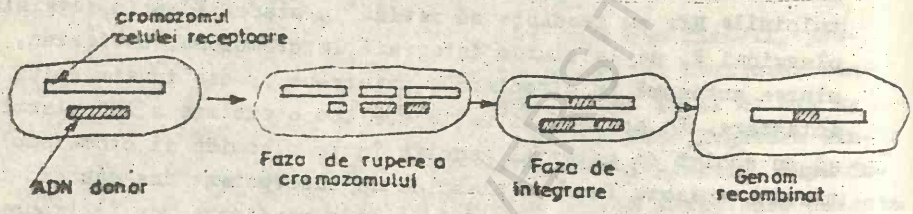


Fig.63. Mecanismul de recombinare genetică după ipoteza „rupere - reunire".

- Ipoteza „copierii alternative". Conform acestei ipoteze se presupune că nu ar exista nici un schimb de ADN între genomul donatorului și cel al receptorului și că sinteza moleculei de ADN nou, în cursul replicării s-ar face folosind alternativ ca matriță o catenă de ADN de la donor și alta de la receptor.

Deși infirmată de o serie de date experimentale, această ipoteză mai este încă acceptată de unii specialiști.

- Ipoteza „rupere și copiere", preconizează formarea cromozomului recombinat prin secționarea fizică a unui genom parental și copierea celuilalt (fig.64).

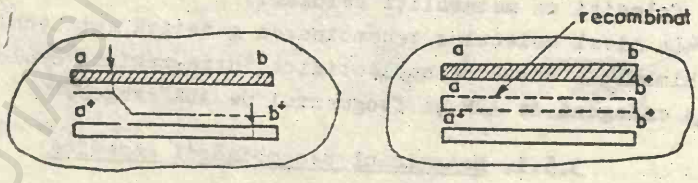


Fig.64. Mecanismul recombinării genetice după ipoteza „rupere și copiere".

Prin intermediul acestui mecanism, în cazul existenţei a doi cromosoni parientali alăturaţi din segmentele "ab" şi "a^+b^+" se poate forma un cromozom recombinat, în care segmentul "a" dintr-un cromozom să devină legat de un segment "b^+" nou sintetizat pe matrita celui existent.

In 1980 Kornberg arată însă că singura ipoteză variabilă şi plauzibilă rămîne totuşi ipoteza „rupere şi reunire", ea fiind valabilă atît la procariote cît şi la eucariote.

4. Codul genetic

Codul genetic reprezintă ansamblul regulilor şi principiilor în acord cu care informaţia genetică codificată în ADN este „transcrisă" pentru a fi transmisă de la locul său de origine (genom) la dispozitivele care fac sinteza proteinelor în celulă. El redă, totodată, modul în care mesajul genetic „transmis" poate fi „citit" şi „tradus" în secvenţe specifice de aminoacizi.

Funcţia codului genetic poate fi asemănată cu procesul de transmitere a unei informaţii codificate de la sursă (structura biochimică a genomului), pe anumite canale, la locul de recepţie, unde mesajul este decodificat (tradus) şi folosit, în cazul activităţii celulare, în procesul de biosinteză a proteinelor.

Molecula de ADN poartă, deci în structura sa un adevărat cod molecular submicroscopic a cărei semnificaţie este determinată de succesiunea specifică a celor patru baze azotate (A,G,C,T) şi a cărei complexitate este proporţională cu mărimea genomului purtător.

Prima literă	A doua literă								A treia literă
	U		C		A		G		
U	UUU	Fenila.	UCU	Ser.	UAU	Tir.	UGU	Cist.	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu.	UCA		UAA	Term.x)	UGA	Term.x)	A
	UUG		UCG		UAG	Term.x)	UGG	Trip.	G
C	CUU	Leu.	CCU	Pro.	CAU	His.	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Glu.	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile.	ACU	Thr.	AAU	Asp.	AGU	Ser.	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Liz.	AGA	Arg.	A
	AUG	Met.	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val.	GCU	Ala.	GAU	Asp.	GGU	Gly.	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu.	GGA		A
	GUG		GCG		CAG		GGG		G

x) Triplete terminale (STOP)

Fig.65. Codul genetic.

Descifrarea codului genetic constă în stabilirea modului în care un limbaj bazat pe patru litere (A,G,C,U) poate alcătui un cod de 20 cuvinte, corespunzător celor 20 aminoacizi din structura proteinelor, care la rîndul lor pot fi definite printr-un limbaj redat de 20 litere.

Unitatea fundamentală de codificare ce stă la baza codului genetic este codonul. După Gamov (1954) codonul ar reprezenta cea mai mică secvenţă nucleotidică de codificare a unui aminoacid. Codonul este format din trei baze care formează un codon triplet. O asemenea secvenţionalizare nucleotidică poate codifica 4^3 cuvinte, adică 4 baze azotate cît intră în structura ADN ridicate la puterea a treia, ce reprezintă bazele din codonul triplet. In felul acesta se obţin 64 combinaţii posibile (fig.65), mai mult

decît ar fi nevoie pentru codificarea celor 20 aminoacizi. Aceasta face ca unul şi acelaşi aminoacid să fie codificat de mai multe triplete codon. In acord cu această concepţie o genă obişnuită de dimensiuni medii, alcătuită din 1500 perechi de nucleotide este subdivizată în 500 unităţi de citire sau codoni. Fiecare dintre aceştia codifică cîte un aminoacid (deci 500 aminoacizi) care vor intra în structura unei proteine. O astfel de proteină cu aproximativ 500 aminoacizi în moleculă este o proteină medie cu o greutate moleculară de 30-50000 daltoni.

4.1. Citirea codului genetic

Codul genetic este fără „virgulă", ceea ce înseamnă că nu există nici un semn de punctuaţie sau semnal care să indice sfîrşitul unui codon sau începutul altuia. Cuvintele de cod sau tripletele au o polaritate sau direcţie specifică. Pentru aceste considerente codonul GUU va codifica întotdeauna valina, iar UUG va codifica numai leucina. Cadrul de citire a informaţiei genetice trebuie stabilit cu rigurozitate la începutul moleculei de ARN_m şi este marcat, în mod normal prin prezenţa codonului AUG (codonul iniţiator), care codifică formilmetionina la procariote şi metionina la eucariote. Citirea codonilor sau decodificarea ARN_m se face, după aceea, secvenţial de la o tripletă la alta, într-o direcţie specifică de-a lungul moleculei de ARN_m, pînă întîlneşte un codon STOP sau NONSENS, care semnifică terminarea sintezei lanţului polipeptidic (Term.). Citirea începe întotdeauna de la stînga (de la capătul 5 al moleculei de ARN_m) spre dreapta (la capătul 3 al moleculei de ARN_m). Deci, direcţia de citire a mesajului genetic de pe ARN_m este 5' ⟶ 3', aceeaşi ca şi direcţia de biosinteză a ADN şi ARN.

Dacă citirea mesajului genetic înscris în ADN începe cu un singur triplet (AUG), sfîrşitul citirii mesajului este făcută de trei codoni (UAA, UAG şi UGA) ei jucînd rolul de codoni stop.

Spre deosebire de codonul iniţiator, codonii STOP nu sînt citiţi de molecula de ARN_t specializată în aranjarea aminoacizilor în molecula de proteină. Ca urmare a acestui fapt lanţul de biosinteză sfîrşeşte.

5. Ingineria genetică a microorganismelor

5.1. Ingineria genetică şi bioingineria

Scopul fiecărei biotehnologii constă în obţinerea unor pro-

ducţii cît mai mare cu microorganisme înalt productive şi stabile genetic.

Procedele biochimice, fiziologice şi tehnologice pot fi dirijate şi controlate sau chiar modificate în raport cu scopul urmărit de biotehnologie. Pentru aceasta este nevoie de o corelare perfectă între necesităţile microorganismului şi sistemul biotehnologic de creştere şi producere.

Ingineria genetică nu face altceva decît să creeze sisteme genetice noi care să ofere posibilităţi de manifestare net superioare în cadrul unui sistem bioinginerese.

Pe calea ingineriei genetice este posibil includerea în genomul unei celule microbiene a unor serii întregi de gene noi, inclusiv unele gene biologic independente. Deci, microorganismului i se imprimă însuşiri şi proprietăţi noi.

Principalul instrument de lucru în ingineria genetică este gena. Prin manipularea acesteia, folosindu-se metodele ingineriei genetice se obţin noi producători mai productivi şi mai eficienţi. Metodele şi procedeele folosite de ingineria genetică sînt grupate sub un nume comun: tehnologia ADN recombinat.

Procesul de constituire a unui ADN recombinat presupune:

1) noţiuni clare despre mecanismul molecular de funcţionare a genelor;

2) deţinerea de mijloace de izolare a genelor;

3) cunoaşterea posibilităţilor de „sudare" a genelor în ordinea dorită;

4) cunoaşterea posibilităţilor de inducere a ADN recombinant în organismul receptor şi crearea de condiţii de stabilitate a manifestărilor sale.

Pe de altă parte, bioinginerie trebuie să vină şi să definitiveze realizările ingineriei genetice prin asigurarea unor condiţii specifice în cadrul sistemului de cultivare. Deci, bioingineria trebuie să conceapă acele aparate şi mecanisme prin care se poate realiza controlul şi conducerea unui metabolism complex cum este cel al microorganismului modificat genetic.

5.2. Posibilităţi de folosire ale ingineriei genetice în biotehnologie

Metodele actuale de inginerie genetică au permis obţinerea unor supraproducători, unii deja utilizaţi în industria biotehnologică. Procedeul principal de creştere a cantităţii de produs

finit pe calea ingineriei genetice, se face prin creşterea numărului de copii ale genei producătoare, prin includerea acestor copii în plasmida recombinată. De exemplu, supraproducătorul de treonină se obţine pe calea creşterii numărului de gene răspunzătoare de sinteza enzimelor anabolice ale treoninei. Pentru aceasta se face clonarea (introducerea) acestor gene pe una din plasmidele de la E coli, ce a permis crearea unei tulpini cu o activitate biosintetică de 10 ori mai mare decît tulpina iniţială.

O sarcină extrem de importantă pentru ingineria genetică este şi lărgirea spectrului substraturilor folosite de microorganismele industriale. Astfel, în scopul creării de tulpini producătoare de proteine microbiene, capabile să crească pe medii ieftine cum ar fi zerul din lapte sau deşeurile cu conţinut de celuloză, se face clonarea în Sacoharomyces cerevisee a genelor apte să codifice sinteza beta-galactozidazei şi a xilozoizomarazei. Pe de altă parte, pentru industria alimentară o sarcină importantă este obţinerea de tulpini de drojdii capabile să fermenteze nemijlocit amidonul şi celuloza sau de obţinere a unor producători piranozooxidazici care să realizeze izomerizarea glucozei în fructoză.

Prin lărgirea spectrului de substraturi utilizate de microorganisme se ajunge la o protecţie mult mai eficientă a mediului înconjurător împotriva poluării. Astfel, prin tehnici de inginerie genetică s-a reuşit să se obţină tulpini de Pseudomonas capabile să utilizeze hidraţii de carbon din petrol, tulpini de drojdii rezistente la insecticide, precum şi alte microorganisme cu efecte biodegradante asupra multor substanţe din mediu.

De asemenea, prin tehnici de inginerie genetică se poate mări eficienţa utilizării substratului şi se poate îmbunătăţi calitatea produsului finit. De exemplu, prin înlocuirea sistemului de asimilare a azotului la Methylophylus methylotropus, care are consum energetic sporit, cu un sistem mult mai economic din E.coli, clonîndu-se gena de biosinteză a glutamatdahidrogenazei, s-a reuşit să se crească mult eficienţa utilizării radicalului amino din sursa de azot şi deci producţia de proteine microbiene.

Metodele ingineriei genetice pot fi folosite pentru creşterea productivităţii de biosinteză prin mărirea rezistenţei producătorilor la produsul final de biosinteză, care este cunoscut că de cele mai multe ori are efecte inhibante asupra procesului, blocîndu-l. In acest sens se poate da ca exemplu produ-

cerea de alcool etilic pe cale biotehnologică. Microorganismul producător de alcool etilic tolerează anumite concentraţii a acestuia în mediul de proces, depăşirea acestei concentraţii conduce la blocarea activităţilor biosintetice şi scăderea producţiei. Apoi, biosinteza antibioticelor aminoglicozidice poate fi sporită prin introducerea în genomul actinomicetului producător a genelor care codifică sinteza enzimelor ce transformă aminoglicozidele.

Multe dintre organismele eucariote produc proteine, însă în cantităţi insuficiente. In ultimii 20 de ani ingineria genetică a oferit posibilitatea introducerii unor gene de eucariote înalt producătoare de proteine în celula microbiană, reuşindu-se în felul acesta să se obţină producători de înaltă valoare.

Rezultate spectaculoase s-au obţinut prin introducerea de gene de la eucariote la microorganisme în cazul insulinei, hormonilor de creştere, a interferonului, a virusului febrei aftoase etc.

Succesele ingineriei genetice în biotehnologie sînt ilustrate grăitor în producerea de interferon. Pentru necesităţile medicale biotehnologia poate să producă în prezent orice cantitate de interferon. In această direcţie ingineria genetică a avut un aport remarcabil, transferînd gene producătoare din ţesutul animal în celula de E.coli. In felul acesta producţia a crescut de la 10^8 unităţi, cînd obţinerea se făcea pe ţesut animal, la 10^{10} unităţi, cînd obţinerea de interferon se face cu E.coli. In plus, calea de obţinere este mult mai economicoasă şi mai eficientă.

Folosirea intensivă a realizărilor ingineriei genetice a fost frînată, însă, de insuficienta aprofundare a aspectelor inginereşti a instalaţiilor şi proceselor pe care le propune biotehnologia. Proiectarea şi construirea unor instalaţii şi aparate de înaltă tehnicitate este de cele mai multe ori o mare necesitate.

Producerea pe scară largă a unor substanţe cu ajutorul microorganismelor recombinante (obţinute prin inginerie genetică) poate fi frînată uneori şi din considerente de ordin biologic. In această categorie de considerente ar putea fi incluse:

1) instabilitatea genetică a elementelor extracromozomale (plasmide), care pot fi eliminate din celula recombinantă. In felul acesta producătorul îşi pierde proprietăţile biosin-

tetice dobîndite pe calea ingineriei genetice. Acest fenomen poate să apară ca urmare a stresului continuu la care este supusă celula recombinantă prin producerea de proteine omogene ce în mod implicit reduce rata de multiplicare şi supravieţuire;

2) insuficienta cunoaştere a geneticii microorganismului de interes industrial. Majoritatea microorganismelor recombinante sînt create pe baza bacteriei E.coli care acumulează produsele în celulă în cantităţi relativ limitate. Cercetarea din punct de vedere genetic şi a ingineriei genetice şi a altor microorganisme (bacterii şi drojdii) ar creşte şansele viabilităţii unor procese microbiene industriale;

3) microorganismul producător are o toleranţă redusă faţă de concentraţii mari de produs finit.

Cu toate acestea ingineria genetică este într-un progres continuu şi cu certitudine se vor găsi posibilităţile de înlăturare a acestor impedimente.

5.3. Metode şi tehnici de inginerie genetică

In anul 1977, Grobstein reuneşte sub denumirea de tehnologie ADN recombinant (inginerie genetică) toate metodele şi tehnicile care fac posibilă manipularea directă a moleculelor de acizi nucleici, permiţînd introducerea deliberată de la o specie la alta a unor secvenţe nucleotidice cunoscute.

Ceva mai recent, Freedland - Judson consideră că ingineria genelor nu este altceva decît o serie de metode complexe, dar bazate pe principii simple, prin care anumite gene sau grupuri de gene sînt extrase dintr-o celulă şi introduse în altă celulă, unde sînt legate de genomul acesteia modificîndu-i proprietăţile biochimice. Deci, ingineria genetică operează cu o serie de metode şi tehnici prin care se asigură stabilitatea şi viabilitatea materialului genetic, astfel încît transferarea sa la noul individ să-i ofere proprietăţi noi, nemaiîntîlnite la nici unul dintre indivizii de la care s-a pornit.

Orice fragment de ADN, fie el de natură virală sau de natură bacteriană şi fungică, odată ajuns în celula receptoare este supus unor procese de modificare, care se fac prin intermediul unor „instrumente" specifice celulare. In categoria acestora intră: enzimele de restricţie, ligazele, vectorii, reverstranscriptazele, protoplaştii, etc.

5.3.1. Endonucleazele de restricţie

Cunoscute şi sub numele de bisturiile ingineriei genetice, endonucleazele de restricţie sînt enzime cu ajutorul cărora molecula de ADN este tăiată în locuri foarte precise, avînd totodată posibilitatea ca cele două secţiuni efectuate pe catena de ADN dublu catenară să fie distanţate, oferind astfel extremităţi monocatenare complementare disponibile la efectuarea de legături. Acţiunea acestor enzime permite secţionarea moleculelor de ADN de diferite proveninenţe la nivelul aceleiaşi secvenţe şi reunirea lor ulterioară prin intervenţia altor sisteme enzimatice.

Endonucleazele de restricţie sînt enzime cu specificitate de tulpină, care permit celulelor respective să recunoască şi să degradeze rapid orice ADN provenit din surse străine dacă în prealabil nu a fost modificat. De aceea, în ingineria genetică orice moleculă de ADN ce urmează să fie integrată în altă moleculă de ADN este supusă procesului de restricţie şi modificare. Prin urmare, cînd într-o bacterie s-a introdus un fragment de ADN exogen nemodificat, bacteria „se va apăra" împotriva acestuia cu ajutorul enzimelor de restricţie, care au rolul de a scinda molecula de ADN străin în fragmente mai mici, deci de al modifica. In acest caz se spune că ADN a suferit un proces de restricţie. Molecula de ADN modificată de celula gazdă este acceptată sub această formă şi poate fi integrat în cromozomul microbian prin mecanisme celulare specifice.

Mecanismele de modificare a ADN exogen constau în metilarea enzimatică a acestuia în locurile dictate de restrictaze. Această activitate de restricţie şi modificare a moleculei de ADN străin celulei este realizată de gene care codifică producerea enzimelor ce intervin în proces şi care sînt localizate pe cromozomul bacterian al celulei gazdă. Deci, determinanţii genetici ai procesului de restricţie şi modificare se găsesc în celula gazdă, în plasmidele acestora sau fagii bacterieni.

Determinanţii genetici sînt de natură enzimatică şi ei pot fi grupaţi în două categorii, după cum participă la restricţie sau la modificarea ADN exogen:

1) Enzime de restricţie, care recunosc scurte secvenţe din molecula de ADN, pe care le clivează în fragmente nefuncţionale de diferite lungimi. Prin acest mecanism informaţia genetică din celula bacteriană gazdă este protejată, iar ADN exogen este distrus. In această categorie intră toate enzimele cunoscute sub numele de endonucleaze de restricţie.

2) Enzime de modificare, care recunosc secvenţile de ADN exogen sau fragmente din acestea, pe care le modifică în aşa fel încît nu mai pot fi clivate de endonucleaze. In această categorie intră enzimele de metilare (metilazele) şi unele transferaze (alfa-beta-glicoziltransferaza).

- Enzimele de restricţie sau endonucleazele de restricţie pot produce trei tipuri de fragmente de ADN, aceasta în raport cu situsul de clivare şi particularităţile structurale ale extremităţilor fragmentelor rezultate din acţiunea lor. Ele pot fi:

a) enzime de restricţie care secţionează ambele catene ale ADN dublu catenar în acelaşi loc, în mijlocul secvenţei de recunoaştere, la nivelul axului de simetrie rotaţională. Fragmentele de ADN rezultate au capetele drepte şi sînt dublu catenare;

b) enzime de restricţie care taie cele două capete de ADN dublu catenare decalat, de o parte sau de alta a axului de simetrie. Fragmentele de ADN rezultate vor prezenta o extremitate monocatenară;

c) enzime care taie molecula de ADN la întîmplare, asimetric. Aceasta face ca toate fragmentele rezultate să aibă extremităţi monocatenare cu un număr variabil de baze (5-10), cu secvenţe nespecifice.

- Enzime de modificare sînt acele care modifică natura bazelor fragmentelor de ADN exogen, făcîndu-l rezistent la acţiunea endonucleazelor. Modificarea ADN sub acţiunea acestor enzime se poate face prin metilarea unor baze azotate sau prin glicoliza ADN cu ajutorul unor transferaze (alfa-beta-glicoziltransferaza). Modificările prin glicolizare sînt caracteristice fagilor din seria T par care conţine în structura lor o bază pirimidinică specifică, 5-hidroximetilcitozina, în loc de citozină. In cursul procesului de modificare resturile de hidroximetilcitozină sînt total sau parţial glicolizate prin intervenţia enzimelor de clivare (transferazelor).

Descoperirea endonucleazelor de restricţie şi a mecanismelor de modificare au deschis noi perspective pentru industria biotehnologică. Au devenit astfel posibilă aprofundarea fizică, chimică şi genetică a moleculei de ADN precum şi controlarea unor procese intime de recombinarea genetică, cu posibilităţi de obţinere a unor indivizi mai productivi şi mai stabili din punct de vedere genetic.

5.3.2. Plasmidele

Moleculele de ADN provenite de la un individ străin (procariot sau eucariot) nu pot fi incorporate direct în cromozomul unor microorganisme şi nici nu pot să se repice autonom. De aceea ele trebuiesc anterior integrate într-un ADN capabil de replicare autonomă. Acel ADN capabil de integrare şi care joacă şi rol de vehicul este cunoscut sub numele de plasmidă.

Plasmidele microbiene posedă o serie de proprietăţi care le fac pretabile funcţiei de vehicul de clone (gene).

Plasmidele sînt unităţi genetice extracromozomale, formate din molecule de ADN dublu catenar ce se transmit de la o celulă la alta, în ea fiind inclusă informaţie genetică diferită de cea a cromosomului celulei gazde. In general, plasmidele sînt acelea care dau rezistenţă unui microorganism la unele antibiotice sau factori de mediu.

Plasmidele pot fi libere în citoplasma microbiană (plasmide extracromozomiale), sau pot fi integrate în cromozomul microbian. Cînd plasmidele sînt libere în citoplasma celulei gazde ele se replică autonom, pe cînd cele integrate în cromozom se replică în acelaşi timp [illegible] (fig.66).

Plasmidele sînt caracteristice în special bacteriilor, ele fiind răspîndite atît la bacteriile Gram-pozitive cît şi la cele Gram-negative. In general, plasmidele nu sînt esenţiale pentru viaţa celulei. Există o serie de celule care necesită prezenţa factorului F' pentru creştere, acesta jucînd rol de plasmidă.

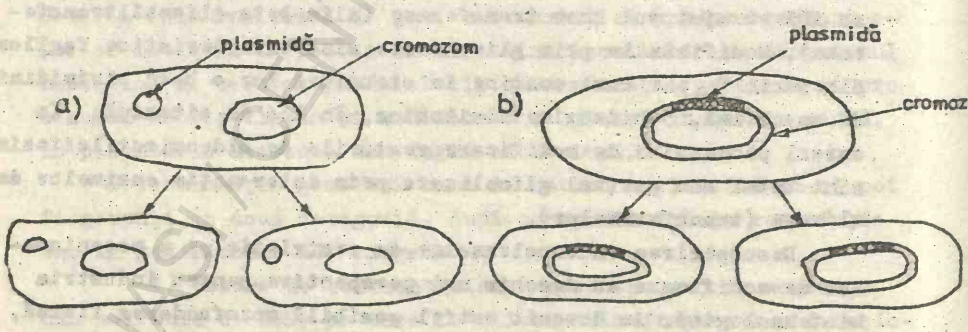


Fig.66. Poziţia plasmidelor în celula microbiană
a) plasmidă liberă în citoplasma microbiană;
b) plasmidă integrată în cromozomul microbian.

Multe plasmide extracromozomale posedă abilitatea de a se integra în anumite condiţii în cromozomul bacterian, fapt pentru care utilizarea lor în tehnici de inginerie genetică este pretabilă.

Plasmidele pot conferi celulei gazdă unele proprietăţi fenotipice noi cum ar fi: rezistenţa la antibiotice, producerea de antibiotice, degradarea compuşilor aromatici, fermentarea zaharurilor, producerea de hemolizină, producerea de endotoxină, restricţia şi modificarea controlată a ADN celulei gazde, etc.

Din punct de vedere structural întotdeauna conţinutul de G+C din ADN cromozomal este diferit de cel al ADN plasmidial, fapt ce permite separarea şi recunoaşterea celor două tipuri de ADN din celula bacteriană. O plasmidă oricât de mică ar fi ea, este formată din mai multe tipuri de gene. De exemplu, plasmida pBR 322 este formată din următoarele tipuri de gene (fig.67) : gene structurale, gene de rezistenţă la antibiotice (tetraciclină şi ampicilină), la care se adaugă o serie de situsuri (situsuri de recunoaştere şi clivare a enzimelor de restricţie sau situsuri de recunoaştere şi clivare) şi gene care indică originea replicării.

Numărul de gene a unei plasmide este variabil. Plasmidele mici au un număr de 3.000 - 20.000 de gene, acestea sînt cele mai folosite în ingineria genetică, iar unele conţin peste 20.000 de gene, ele fiind plasmide mari cu utilizare limitată în ingineria genetică.

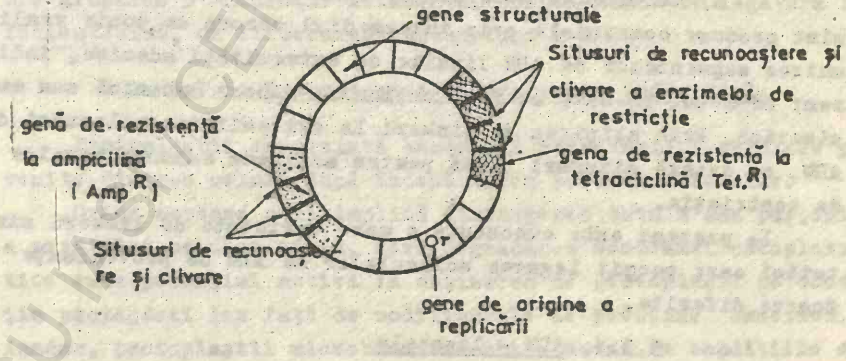


Fig.67. Structura plasmidei pBR 322.

5.3.3. Clonarea genelor

Procesul celular prin care ADN exogen (străin) este integrat în structura unui vector (plasmidă sau fag) poartă numele de clonare. Pentru integrarea fragmentelor de ADN străin în ADN vehicolului de clonare se poate recurge la una din următoarele tehnici sau metode:

1) Utilizarea fragmentelor de ADN produse de restricta-ze. Este o metodă simplă prin care ADN exogen este integrat în ADN vehiculului. Prin această metodă se poate integra fragmente de ADN care au fost obţinute prin acţiunea enzimelor de restricţie cu acţiune la distanţe egale de axul de simetrie al secvenţei de recunoaştere. Un astfel de ADN prezintă prelungiri monocatenare complementare care se vor uni cu extremităţi similare de pe molecula de ADN de integrare a vehiculului.

2) Clonarea fragmentelor de ADN cu extremităţi tăiate drept. Pentru realizarea legăturilor dintre fragmentele de ADN şi molecula de ADN a vehiculului se pot folosi mai multe metode:

a) una dintre aceste metode foloseşte procedura de legare a aşa numitelor „cozi" sau prelungiri monocatenare de ADN la ADN vehiculului. In felul acesta se obţin molecule de ADN cu „cozi" complementare care funcţionează ca unităţi adezive;

b) utilizarea ADN-ligazei T_4, prin această metodă segmente de ADN tăiate drept de endonucleazele de restricţie sînt legate cap la cap cu ajutorul ADN-ligazelor, enzime speciale cu rol în realizarea de legături intercatenare. In această situaţie nu mai sînt nevoie de capete adezive de legare;

c) utilizarea moleculelor linker. Moleculele linker sînt produse comerciale prin intermediul cărora se poate realiza unirea segmentelor de ADN lipsite de extremităţi adezive, indiferent de modul în care au fost obţinute: rupere mecanică sau enzimatică. Prin alipirea de linkeri la extremitatea moleculei de ADN, se creează situsuri ţintă pentru acţiunea endonucleazelor de restricţie.

In prezent este cunoscută o mare varietate de linkeri sintetici care permit legarea moleculelor de ADN de proveniente foarte diferite.

5.3.4. ADN - ligazele

Sudarea ADN celulei gazde cu ADN extracelular, plasmidial şi fagic este realizată de enzime specializate cunoscute sub

numele de ADN-ligaze. Ele sînt enzime care catalizează reacţiile de sinteză fapt pentru care au mai fost numite şi sintetaze.

ADN-ligazele catalizează formarea unor legături covalente fosfodiesterice între capetele 3'-hidroxil şi 5'-fosfat al unor fragmente de ADN dublu catenar, concomitent cu ruperea unor legături pirofosforice la nivelul moleculei de NAD şi ATP care furnizează energia de legare.

La ora actuală ADN-ligazele cele mai bine caracterizate şi care au găsit o largă utilizare în ingineria genetică sînt cele de natură bacteriană, izolate în special de la E.coli. Se cunosc două tipuri de ligaze:

a) unele ce provin de la E.coli infectată cu bacteriofagul T_4;

b) altele care provin de la E.coli neinfectată.

5.3.4.1. Mecanismul de acţiune a ADN-ligazelor

Sinteza legăturilor fosfodiesterice între cele două fragmente de ADN, are loc printr-o reacţie care se desfăşoară în trei etape:

a) Într-o primă etapă are loc interacţiunea enzimei cu ATP, prin care se produce energia de reacţie şi se furnizează grupările adenil necesare procesului de reacţie. În urma acestei interacţiuni se formează adenilatligaza şi acidul pirofosforic (PP_i).

b) În etala a II-a gruparea adenil este transferată ADN-lui, obţinîndu-se o legătură nouă, de tip pirofosfat, între AMP şi gruparea 5'-fosfat terminală a crestăturii.

c) În cea de a III-a etapă 5'fosfatul este atacat de către gruparea 3'-hidroxil adiacentă, constituindu-se legătura fosfodiesterică, cu eliberarea concomitent a AMP.

5.3.5. Protoplaştii şi procesele industriale

Protoplaştii reprezintă ansamblul structurilor celulare provenite dintr-o celulă după îndepărtarea peretelui celular.

Orice acţiune care implică distrugerea totală sau parţială a peretelui celular rigid, fără degradarea membranei citoplasmatice este potenţial activă în obţinerea de protoplaşti cu condiţia protejării lor faţă de modificările de presiune osmotică. Aşadar, protoplaştii microbieni se obţin numai în condiţiile de

mediu potrivit care face ca formaţiunea care rezultă să-şi păstreze proprietăţile şi activităţile vitale.

Obţinerea de protoplaşti se face în mai multe etape succesive (fig.68): 1) sensibilizarea peretelui celular; 2) eliberarea parţială a protoplastului; 3) eliberarea totală a protoplastului; 4) stabilizarea osmotică a protoplastului.

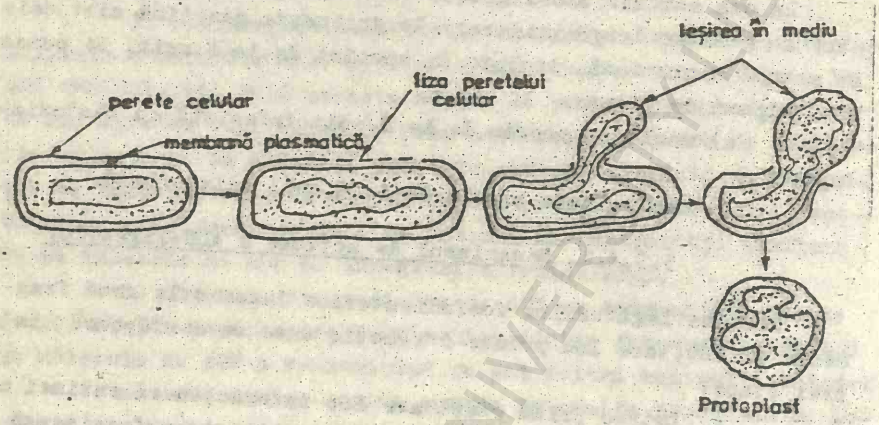


Fig.68. Modul de formare a protoplastului.

In cazul bacteriilor Gram-pozitive protoplaştii se pot obţine prin tratarea celulei cu lizozim şi crearea condiţiilor de tonism corespunzătoare. Bacteriile crescute în medii cu conţinut mare în glicină pierd uşor peretele celular. Acest efect se presupune că ar apărea ca urmare a înlocuirii restului de D-alanină din structura peptidoglicanului peretelui celular.

In cazul bacteriilor Gram-negative lizozimul nu distruge decît pătura de mureină, manşonul extern rămînînd intact. Prin cultivarea succesivă a acestora se pierde şi manşonul extern, celula transformîndu-se în protoplast.

In procesul de obţinere a protoplaştilor, trebuie să se ţină cont de variaţiile de presiune osmotică care devine unul din factorii esenţiali în stabilizarea proprietăţilor lor. Pentru păstrarea unei presiuni osmotice relativ constante se folosesc diferite substanţe tampon precum şi unele substanţe stabilizatoare, creîndu-se astfel condiţii de izotorism corespunzătoare păstrării integrităţii membranei plasmatice.

Mediile de cultură folosite în obţinerea protoplaştilor trebuie să conţină substanţe stabilizatoare corespunzătoare. Pînă în prezent nu se cunoaşte un stabilizator osmotic universal, însă există o serie de substanţe care se pot folosi cu succes ca stabilizatori osmotici. De exemplu, glucoza 0,3 M, rafinoza, melebioza, trehaloza 0,15 M, zaharoza 0,5 M, citratul de sodiu 0,5 M, succinatul de sodiu 0,5 M sînt toate substanţe stabilizatoare osmotic care au dat rezultate foarte bune în obţinerea de protoplaşti. Substanţele tampon intră în compoziţia mediului de cultură sub formă de combinaţii de fosfaţi mono- şi dipotasici sau sodici. In ultimul timp se utilizează ca substanţă tampon şi polietilenglicolul (PEG) cu greutate moleculară 4000 şi în concentraţie de 7,5 g/l.

O importanţă majoră în tehnologia obţinerii protoplaştilor o are procedeul de izolare. Este cunoscut că protoplaştii sînt foarte fragili şi se pot deteriora pe parcursul diferitelor etape, de lucru. Pentru aceasta este recomandat utilizarea metodelor rapide şi cu puţine etape. De mare importanţă pentru creşterea ratei de obţinere a protoplaştilor este temperatura de incubare a celulelor în soluţia enzimatică de lizozim, precum şi timpul de expunere la aceasta. Se apreciază că temperatura optimă de obţinere a protoplaştilor ar fi în jur de 30°C, iar timpul de expunere este de 20-45 min.

5.3.5.1. Fuzionarea protoplaştilor

Protoplaştii odată obţinuţi se pot folosi în cercetări de inginerie genetică pentru obţinerea de forme microbiene cu caractere genetice noi. Pentru aceasta protoplaştii trebuie să fuzioneze între ei. Fuziunea se poate face între protoplaştii proveniţi de la aceeaşi specie sau de la specii diferite. Cînd fuziunea are loc între indivizii aceleiaşi specii, fenomenul poartă numele de fuziune intraspecifică, iar cînd ea are loc între specii diferite (de exemplu, fuziunea dintre Bacillus şi Streptomyces) fenomenul este cunoscut sub numele de fuziune interspecifică.

Fuziunea protoplaştilor se poate realiza pe diferite căi. Una din aceste căi este expunerea în cîmp electric a doi protoplaşti. In această situaţie se utilizează un cîmp electric de o anumită intensitate, de aproximativ 1-20 Kv/cm, protoplaştii fiind expuşi acestui curent timp de cîteva microsecunde.

Fuziunea protoplaştilor se poate realiza şi prin activare termică, prin acţiunea UV, sau prin acţiunea unor antibiotice.

Fuziunea de protoplaşti, indiferent pe ce cale se realizează, trebuie să conducă la obţinerea unor recombinaţi genetici cu caractere noi. Prin aceasta se realizează un transfer de informaţie genetică de la un microorganism la altul.

Fuziunea protoplaştilor se realizează în mai multe etape (fig.69).

Intr-o primă etapă are loc aglutinarea protoplaştilor, fenomen produs de dezhidratarea intensă şi formarea de agregate

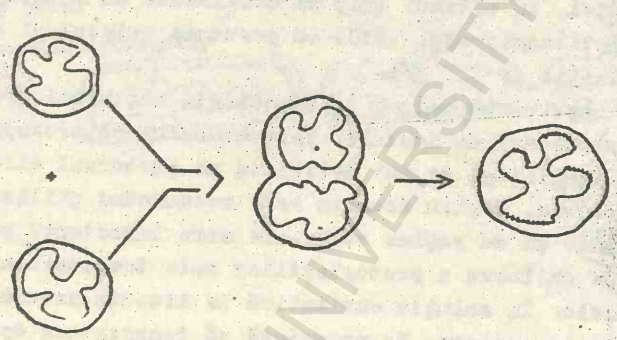


Fig.69. Reprezentarea schematică a fuziunii protoplaştilor.

de diferite dimensiuni. In etapa imediat următoare se constată contactarea lor şi schimbarea formei. De la forma sferică protoplaştii trec în formă mai mult sau mai puţin ovală, turtită,etc. Urmează intrarea în contact a protoplaştilor. La locul de contact are loc o translocaţie de proteine membranare, urmată de interacţiuni lipidice între membranele adiacente. Această interacţiune, urmată de reorganizarea moleculară a membranei duce la fuziunea propriu-zisă. Se constată că se formează mici punţi citoplasmatice, care cresc progresiv determinînd fuziunea protoplaştilor.

5.3.5.2. Genetica fuziunii protoplaştilor

Spre deosebire de celelalte mecanisme de transfer genetic, care au un caracter unitar (se execută de la donor la receptor), în sisteme de fuziune a protoplaştilor nu există polaritate. Cei doi parteneri sînt egali atît în capacitatea de a dona,cît şi în capacitatea de a primi informaţia genetică şi deci, de

a forma recombinanţi genetici adevăraţi. Procesul de fuziune a protoplaştilor nu este limitat de nici o barieră genetică sau de incompatibilitate.

Recombinarea genetică a microorganismelor prin intermediul protoplaştilor este singura cale de transfer a informaţiei genetice la acele microorganisme care nu posedă alte mijloace de transfer. Ea oferă posibilitatea unică de a reuni într-o singură entitate celulară două sau mai multe genoame diferite şi complete din punct de vedere genetic, în locul transferului unor fragmente de ADN mai mult sau mai puţin eficiente.

Microorganismele ce aparţin genurilor Streptomyces şi Bacillus la care s-au realizat cele mai multe fuziuni de protoplaşti se numără printre microorganismele de interes industrial. Prin fuzionarea materialelor lor genetice s-au obţinut indivizi cu înaltă productivitate şi mai eficienţi economic.

Obţinerea de recombinanţi genetici prin fuziunea interspecifică va permite combinarea într-o singură celulă a caracterelor genetice obţinute prin mutageneză, conservînd şi dezvoltînd potenţialul productiv al microorganismelor de interes industrial.

In cazul microorganismelor producătoare de antibiotice prin fuziunea de protoplaşti apare posibilitatea obţinerii unor noi antibiotice rezistente la atacul enzimatic microbian.

Aplicarea fuziunii protoplaştilor la microorganismele eucariote a dat, de asemenea rezultate importante. De exemplu, fermentaţia berei după tehnologiile convenţionale determină formarea unui produs care conţine cantităţi importante de dextrine, polizaharide nefermentascibile care diminuează calităţile produsului finit. Utilizînd tehnica de fuziune a protoplaştilor s-a reuşit obţinerea unor hibrizi stabili prin combinarea tulpinii industriale de Saccharomyces carlsbergenis cu tulpina S.diastaticus, cu care se produce o bere cu conţinut scăzut de dextrine şi cu aromă foarte plăcută.

BCU IAŞI

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C A P I T O L U L VII

BACTERIOFAGII SI PROCESELE INDUSTRIALE

Bacteriofagii sînt virusuri adaptate parazitismului celulei bacteriene şi care, prin multiplicare produc liza acestora.

Bacteriofagii au fost descoperiţi în anul 1915 de către Twort care constată liza celulelor bacteriene şi care la momentul respectiv o interpreta ca o etapă a ciclului de viaţă a bacteriei. Ulterior, D'Hérell (1917) arată că liza celulei bacteriene s-ar datora unui virus pe care l-a numit bacteriofag (virus mîncător de bacterii) sau fag. După 1940, sistemul bacteriofag - bacteria a fost folosit ca model experimental pentru cele mai importante studii de genetică: replicarea acizilor nucleici, transcrierea şi traducerea informaţiei genetice, explicarea mecanismului genetic al mutagenezei, recombinarea genetică, etc.

1. Clasificarea bacteriofagilor

Clasificarea bacteriofagilor se face luîndu-se în considerare o serie de caractere morfologice şi structurale. În raport cu acestea bacteriofagii se clasifică astfel:

A. După formă bacteriofagii pot fi:
   1. Bacteriofagi filamentoşi: M_{13};
   2. Bacteriofagi poliedrici: ϕ X 174, f_2, MS_2;
   3. Bacteriofagi cu morfologie complexă: T;

B. După tipul de acid nucleic pe care îl conţin pot fi:
   1. Bacteriofagi cu ADN: , T2, T4, T6, T1, T3, T5, T7;
   2. Bacteriofagi cu ARN: MS_2, f_2, R_{17}, M_{12}, Q, GA, HI, SS, SB ;

C. După modul de multiplicare pot fi:
   1. Bacteriofagi temperaţi: λ
   2. Bacteriofagi virulenţi: T_2
   3. Bacteriofagi latenţi.

BCU IAŞI

2. Morfologia și structura bacteriofagilor

Din punct de vedere morfologic și structural bacteriofagii se deosebesc între ei după cum conțin în structura lor ARN sau ADN.

2.1. Morfologia și structura bacteriofagilor cu ADN

Forma cea mai tipică a bacteriofagilor cu ADN este reprezentată de grupa fagilor T.

Din punct de vedere morfologic și structural acest fag este alcătuit din două părți: cap și coadă (fig.70).

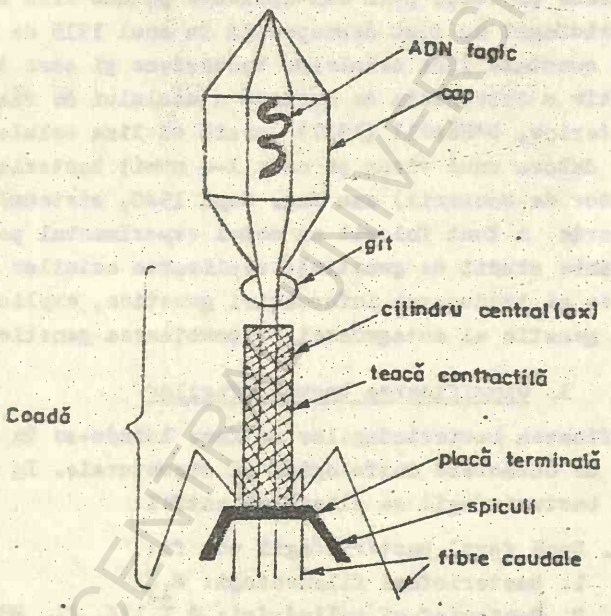


Fig.70. Structura bacteriofagului T_2 (după Topală, 1978).

- Capul fagic, poate fi sfer , cilindric sau prismatic hexagonal. El este format din capsidă proteică și ADN. Împreună aceste două componente formează nucleocapsida.

Capsida reprezintă învelișul protein al materialului genetic (ADN) fagic. Ea poate fi constituită din una sau mai multe molecule de proteine identice, dispuse regulat sau din două sau mai multe straturi concentrice, fiecare fiind constituit din-

tr-un alt tip de proteină.

Unitatea de bază a capsidei este capsomera. Aceasta este formată dintr-un singur lanț polipeptidic sau din mai multe lanțuri polipeptidice identice sau diferite. Capsomerele se grupează în mod ordonat și simetric. După tipul de simetrie a capsomerelor capsidele virale pot fi de trei feluri: cubice-icozaedrice, helicale și binare-mixte.

In interiorul capsidei se găsește genomul fagic sub forma unei molecule de ADN dublu catenare cu o lungime de 50 μm și o greutate moleculară de $1,2 \times 10^7$ daltoni. ADN este format din aproximativ 200 gene împachetate strîns. Intre ADN fagic și proteinele capsidale se stabilesc legături chimice care prin rupere creează o anumită presiune în interiorul capului favorizînd expulzarea materialului genetic în timpul infecției fagice.

- Coada fagului. Are o lungime de 100 μm și este prinsă de cap prin intermediul unei formațiuni morfologice cunoscută sub numele de gît sau guler.

Coada fagului este formată dintr-un cilindru central (ax) rigid și gol care comunică cu capul și se termină cu o formațiune specifică, placa bazală. Axul central este înconjurat de o teacă proteică helicală, teaca contractilă.

Pe placa terminală se fixează 6 filamente caudale, ce reprezintă formațiunile de fixare a bacteriofagului pe bacteria sensibilizată.

2.2. Morfologia și structura bacteriofagilor cu ARN

In categoria bacteriofagilor cu ARN intră virușii cei mai mici ca dimensiuni, cunoscuți pînă în prezent.

Din punct de vedere structural ei prezintă o structură relativ asemănătoare cu cea a bacteriofagilor cu ADN, dar forma și conținutul componenților săi sînt diferiți.

Capsida lor prezintă simetrie cubic-icozaedrică, iar ARN conține numai 3 gene în structura sa. Capsida este lipsită de coadă și este formată din 32 capsomere și 180 subunități componente. Subunitățile sînt identice, fiind constituite dintr-o singură proteină capsidală.

Spre deosebire de bacteriofagii cu ADN, bacteriofagii cu ARN conțin pe lîngă proteina capsidală și o proteină de asamblare numită proteina A, care are rol în asamblarea sa în timpul procesului de multiplicare.

ADN este localizat în interiorul capsidei şi este format dintr-o moleculă monocatenară constituită din 3.300 - 3.500 nucleotide ce intră în structura celor trei gene. Această moleculă este liniară, dar circa 70 % dintre nucleotide sînt împerecheate între ele într-o dublă elice, formînd de-a lungul catenei o serie de bucle.

ADN codifică sinteza a trei proteine ce corespund celor 3 gene. Cele trei proteine codificate sînt: proteina capsidală, proteina de asamblare şi o proteină-enzimă: replicaza virală necesară replicării virionului fagic.

3. Infecţia fagică şi replicarea

Bacteriofagii pentru a deveni virulenţi trebuie să pătrundă în celula gazdă şi să-i perturbe metabolismul, deviindu-l de la propriile sale sinteze, la sinteza de constituienţi fagici. Toate aceste manifestări sînt cunoscute sub numele de infecţie şi replicare fagică (fig.71).

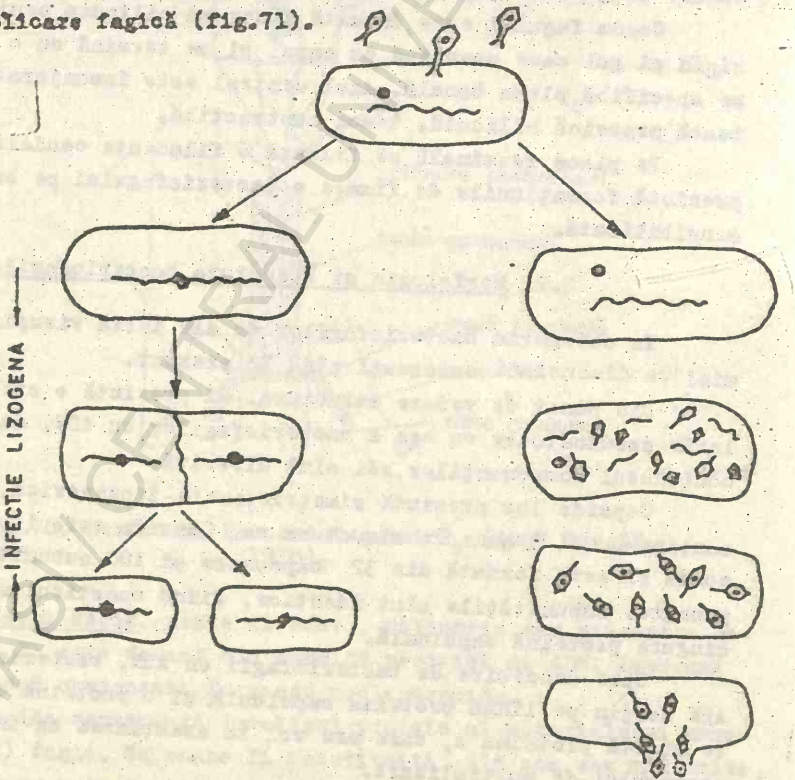


Fig.71. Reprezentarea schematică a principalelor etape a unei infecţii fagice.

In funcţie de modul de comportare a acidului nucleic fagic în celula infectată, infecţia fagică poate urma două direcţii:

1) Bacteriofagul infectează celula bacteriană prin injectarea acidului nucleic propriu, care la nivelul celulei gazde se replică independent sintetizîndu-şi proprii săi constituenţi, iar celula gazdă în final este distrusă. Aceasta este o infecţie litică şi este produsă de bacteriofagi virulenţi.

2) Acidul nucleic fagic, injectat în celula bacteriană se integrează în genomul acesteia, comportîndu-se ca o genă care se replică sincron cu aceasta. Aceşti bacteriofagi sînt cunoscuţi sub numele de bacteriofagi temperaţi, iar reacţia dintre ei şi celula gazdă poartă numele de lizogenie. Bacteriile care poartă şi transmit genomul acestor fagi sînt cunoscute sub numele de bacterii lizogene.

Modul de manifestare a proceselor infecţioase la cele două tipuri de fagi va fi diferită, el fiind în mare măsură dependent şi de acidul nucleic ce intră în structura sa.

3.1. Infecţia şi replicarea fagilor cu ADN

In categoria fagilor cu ADN intră şi fagii seriei T, la aceştia procesul infecţios se desfăşoară în mai multe etape:

1) Etapa de absorbţie şi injecţie fagică.

Pe parcursul acestei etape are loc pe de o parte fixarea fagului pe peretele celular, iar pe de altă parte injecţia ADN fagic în celula bacteriană.

Fixarea fagului pe peretele celular al bacteriei gazde se realizează prin interacţiunea dintre proteinele din coada fagului cu receptorii de pe peretele bacterian. Aceasta face ca bacteriofagii să se fixeze numai pe celulele cu perete celular, nu şi pe protoplaşti, deoarece receptorii specifici sînt localizaţi la acest nivel. Numărul bacteriofagilor ce pot fi fixaţi pe peretele unei celule bacteriene este dependent de numărul de receptori prezenţi la acest nivel. De exemplu, celulele de E.coli pot fixa aproximativ 200-300 fagi pentru care prezintă un număr echivalent de receptori. Receptorii de pe peretele celular sînt specifici pentru fiecare fag. De exemplu, cei specifici pentru fagii T2 şi T6 din seria pară sînt situaţi în pătura lipoproteică a peretelui celular, iar cei specifici fagilor T3, T4, T7 sînt situaţi în pătura lipopolizaharidică a acestuia.

Fixarea fagului se face prin intermediul fibrelor cozii şi a plăcii terminale. Momentul iniţial al fixării este probabil reversibil, dar fixarea devine repede ireversibilă datorită modificărilor de structură de la nivelul fagului. Aceste modificări constau în schimbarea conformaţiei structurale a cozii ca urmare a intervenţiei unei enzime cantonată aici (dehidroxifosfatreductaza). Aceasta face ca $NADPH_2$ să fie eliberat temporar de celulă şi să participe la reacţiile de schimbare a conformaţiei structurale a subunităţilor proteice a cozii şi la contractarea ei. Tot în regiunea cozii, la nivelul plăcii terminale sînt produse enzime cu acţiune litică care atacă legăturile glicozidice depolimerizînd complexul poliglicanic a peretelui celular. Ca urmare a acestor modificări peretele celular se dizlocă local, iar schimbările de contracţie de la nivelul cozii fac ca axul tubular să se insere în celulă şi să traverseze zona de mică rezistenţă, injectînd ADN fagic în interior.

Capul şi coada fagului rămîne în exteriorul celulei unde se vor autoliza. In acest moment se consideră încheiată etapa de injecţie.

2) Etapa proceselor intercelulare.

Imediat după pătrunderea ADN fagic în celula bacteriană are loc dezorganizarea totală a funcţiilor celulare. Procesele de sinteză celulară normală sînt oprite şi intră în funcţie mecanismele care asigură sinteza elementelor fagice.

Oprirea proceselor de sinteză celulară se traduc prin sistarea sintezei proteinelor, paralel cu dezintegrarea cromozomului bacterian, ceea ce pune capăt definitiv diviziunii celulei.

Reorientarea funcţiilor celulare este marcată de apariţia unui ARN special, un ARN_m pentru transcrierea informaţiei de pe ADN fagic, care va codifica sinteza de proteine noi, proteine precoce cu rol de enzime, necesare replicării ADN fagic. Sinteza acestor proteine precoce începe imediat după injectarea ADN viral în celula bacteriană şi se termină după aproximativ 15 min. de la debutul infecţiei. Pe parcursul acestei etape se pot distinge mai multe faze:

a) Faza de sinteză a constituienţilor virali.

Pe parcursul acestei faze se vor sintetiza pe de o parte ADN fagic, iar pe de altă parte, proteinele structurale ale capsidei şi cozii.

- Sinteza ADN debutează cu sinteza unor enzime care degra-

dează ADN celulei gazde, în această situaţie informaţia genetică nu mai poate fi preluată de ARN_m care va dispărea şi el în citoplasmă, iar ribozomii devin disponibili pentru sinteza de proteine fagice.

Enzimele care degradează ADN celulei gazdă vor acţiona asupra acestuia determinînd fragmentarea sa în segmente de aproximativ 10 ori mai mici, asupra cărora vor acţiona endonucleazele fragmentîndu-le pînă la nivelul de nucleotide. Acestea vor fi folosite apoi la sinteza ADN fagic. Are loc totodată transformarea unor nucleotide celulare în nucleotide fagice. Astfel, citozina este transformată în hidroximetilcitozină. Pe baza acesteia şi sub acţiunea unor enzime specifice (ADN-polimeraza, polinucleotidligaza, nucleazelor şi derulazelor) are loc sinteza de ADN specific fagic.

- Sinteza proteinelor fagice se face într-o secvenţă strict ordonată şi în cantităţi corespunzătoare, în acord cu nevoile ciclului de multiplicare. Sinteza lor va fi codificată de ADN fagic.

Printre primele proteine fagice sintetizate sînt cele de structură. Acestea vor intra în structura capsidei fagice. Proteinele capsidale apar în celulă după aproximativ 9 min. de la debutul infecţiei. Numărul lor creşte apoi proporţional cu creşterea conţinutului de ADN fagic nou sintetizat.

Proteinele fagice sînt sintetizate exclusiv pe seama acizilor aminici din mediul celular. Sinteza lor se face la nivelul ribozomilor celulei bacteriene şi pe baza ARN_m fagic.

Urmează apoi sinteza de proteine de structură a cozii şi plăcii fagului prin mecanisme asemănătoare şi pe matriţa ADN fagic.

b) Faza de asamblare a constituienţilor fagici.

Fagul se constituie pe trei linii separate de asamblare care duc independent la formarea capului, cozii şi fibrelor cozii. Unirea lor se va face abia în finalul procesului.

Formarea capului se realizează cu participarea a 200-300 molecule proteine speciale de asamblare care catalizează reacţiile de polimerizare a proteinelor structurale în structuri specifice capului. ADN ce intră în componenţa capului fagic se află în celula gazdă sub formă de molecule lungi poligenomice. Maturarea lor în molecule genomice implică secţionarea, cuplată cu încapsidarea în capul fagic nou sintetizat. Abia după încapsidarea ADN fagic are loc maturarea structurală a capului fagic.

ADN incapsidat se înrulează în cap începînd cu spiralele cele mai îndepărtate (exterioare); ultima porţiune de ADN care intră în cap (situată central) va fi prima care va ieşi în timpul infecţiei fagice.

După încapsidare, structura capului se desăvîrşeşte prin formarea gîtului şi adăugarea cozii sub acţiunea unor enzime specifice.

3) Etapa de liză a bacteriei infectate

Infecţia şi replicarea fagului se încheie brusc prin liza celulei bacteriene şi eliberarea conţinutului ei fagic.

Liza celulei bacteriene pare să fie determinată în cea mai mare parte de acţiunea unei enzime, endolizina, a cărei sinteză este indusă de prezenţa fagului în celulă. Eliberarea fagilor se face foarte repede, fenomenul durînd doar cîteva secunde.

Cu toate că fenomenul decurge foarte rapid, în acest interval de timp celula bacteriană, încearcă prin mecanismele sale redresarea, însă nimic n-o mai poate salva. S-a constatat că dizolvarea peretelui celular bacterian este împiedicată, atît timp cît sistemele sale metabolice n-au fost complet distruse. Cu toate acestea, la un moment dat metabolismul celular încetează, iar liza sa este inevitabilă.

3.2. Infecţia şi replicarea fagilor cu ARN

Sensibilitatea bacteriană la bacteriofagii cu ARN s-a constatat numai la formele „mascule", purtătoare de factori de sex (F^+) şi de pili F.

Ciclul lor infecţios şi de replicare este în general asemănător cu cel al bacteriofagilor cu ADN, el comportînd în principiu aceleaşi etape. Şi în acest caz se disting următoarele etape:

1) Etapa de absorbţie şi infecţie fagică.

Bacteriofagii cu ARN se fixează numai la nivelul pililor F, iar îndepărtarea acestora face ca celulele să devină nereceptive la infecţie. În celula infectată pătrunde numai ARN viral, pătrunderea sa fiind favorizată de o proteină specială, proteina A şi cationii bivalenţi de Ca^{2+} şi Mg^{2+}.

2) Etapa proceselor intracelulare.

Încă din momentul pătrunderii ARN în celula bacteriană are loc o eclipsare a proceselor biosintetice celulare. ARN fagic

joacă acum rol de ARN_m codificînd sinteza a trei proteine: replicaza , proteina A şi proteina capsidală. In aceste sinteze se utilizează ribozomii, ARN_t, acizii aminici şi enzimele bacteriei gazde. Tot ARN fagic serveşte şi drept matriţă pentru replicarea sa cu ajutorul replicazei, folosind pentru aceasta trifosfat nucleotidele celulei gazde. ARN fagic poate să îndeplinească şi funcţia de ARN_m.

Replicarea ARN fagic se face independent de sinteza ARN bacterian al celulei gazdă, pentru aceasta necesită prezenţa replicazei fagice. După efectuarea principalelor sinteze specifice fagice are loc asamblarea componenţilor în structuri fagice tipice. Procesul de asamblare este încă necunoscut. Se presupune că ARN fagic cu proteina A şi proteinele capsidale, prin mecanisme neelucidate, ar constitui fagul.

3.3. Fagi temperaţi şi replicarea lor

In această categorie de fagi intră fagul λ care se aseamănă morfologic şi structural cu fagii seriei T, însă spre deosebire de aceştia ei nu produc liza celulei în care au pătruns. Aceşti fagi sînt cunoscuţi sub numele de fagi temperaţi sau profagi, iar bacteriile care-i poartă sînt bacterii lizogene.

Totuşi şi aceste bacterii în anumite condiţii (acţiunea unor factori fizici şi chimici) pot să fie lizate eliberînd fagi. In această situaţie fagul temperat trece din forma latentă în cea vegetativă virulentă, producînd infecţii urmate de liză celulară.

Toate bacteriile lizogene prezintă două caractere esenţiale:

1) găzduiesc un element specific care poartă numele de profag şi care se poate transforma în fag virulent în anumite condiţii de mediu;

2) sînt imune faţă de fagul respectiv. Liza spontană a unei celule care posedă aceşti fagi şi eliberarea lor în mediu nu va conduce la infecţia altor celule, deoarece acestea sînt imune faţă de ei.

Genomul fagului λ este reprezentat de o moleculă dublu catenară, dar liniară de ADN, lungă de circa 15 μm. Extremităţile moleculei sînt monocatenare şi complementare ceea ce permite împerecherea bazelor şi circularizarea ei.

Fagul λ îşi injectează ADN său liniar în celula bacteriană, dar după penetraţie, ADN se circularizează şi se integrează în cromozomul său. Genomul fagic astfel integrat poartă numele de

profag. Integrarea ADN fagic se face într-un loc bine definit, locusul „att" situat între gena „gal" şi gena „bio". Integrarea se face în prezenţa unei enzime, integraza fagică.

Profagul nu se va replica niciodată autonom. Replicarea sa se va face concomitent cu cea a cromozomului bacterian.

În cromozomul bacterian profagul se comportă ca o genă care va fi transmisă la celulele descendente.

Bacteriile care posedă profage în genomul lor prezintă o serie de caractere noi neîntîlnite la alte bacterii din aceiaşi specie.

4. Importanţa practică a bacteriofagilor

Un rol deosebit de important li se atribuie fagilor ca vectori ai unor gene în procesele de manipulări genetice. Cu ajutorul lor se poate „transporta" într-o celulă bacteriană noi gene ce duc după ele noi caractere. Descoperirea bacteriofagilor, în special a celor temperaţi, a reprezentat noi succese pentru ingineria genetică, care avea să adauge la vectorii ei un nou vector preţios.

În industria biotehnologică, însă, apariţia bacteriofagilor într-un proces microbian poate să conducă la pierderi însemnate care pot merge pînă la pierderea tulpinei. De aceea evidenţierea lor sau a receptorilor specifici celulari este deosebit de importantă, în felul acesta se poate preveni sau înlătura unele cauze care ar putea duce la declanşarea unui proces infecţios.

Pe lîngă cele prezentate, bacteriofagii sînt şi importanţi indicatori ai unor specii bacteriene într-un anumit mediu. De multe ori ei pot fi folosiţi în clasificarea diferitor tipuri de bacterii. Datorită parazitismului lor absolut, bacteriofagii vor însoţi întotdeauna şi peste tot celula gazdă. Identificarea unui bacteriofag într-un mediu dat constituie dovada existenţei în acel loc a microorganismului infectat.

BCU IAŞI

C A P I T O L U L VIII

METODE SI SISTEME DE CULTIVARE A MICROORGANISMELOR

Prin cultivarea unui microorganism se înţelege totalitatea operaţiilor şi lucrărilor prin care se urmăreşte asigurarea condiţiilor de creştere, multiplicare şi producere de substanţe într-un sistem tehnologic dat.

Metodele de cultivare a microorganismelor sînt foarte diferite şi în mare parte dependente de procesul pentru care a fost creat producătorul. Orice proces biotehnologic înainte de a fi elaborat necesită conceperea unei metodologii de cultivare în cadrul unui sistem de cultivare bine delimitat.

1. Metdologia elaborării unui sistem de cultivare

Datorită diversităţii mari a tipurilor de produse şi metaboliţi pentru care sînt cultivate microorganismele, stabilirea unei metodologii universal-valabilă este greu de realizat. Totuşi, privită în ansamblu şi la modul general, metodologia elaborării unui sistem de cultivare este posibil de realizat.

La elaborarea unui sistem de cultivare trebuie să se ţină cont de unii factori, fără de care nu ar fi posibilă conceperea acestuia. Principalii factori de care trebuie ţinut cont în elaborarea unei metodologii de cultivare sînt:

1) forma sub care trebuie cultivat microorganismul: submers sau în suprafaţă;

2) tipul de microorganism utilizat: aerob sau anaerob;

3) condiţii de sterilitate: severe sau mai puţin severe;

4) condiţii de multiplicare: continui sau discontinui.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În linii generale, şi ţinînd cont de aspectele prezentate, o metodologie de cultivare a unui microorganism în cadrul unui sistem biotehnologic cuprinde următoarele etape (fig.79):

1) Obţinerea inoculului vegetativ de laborator.

2) Obţinerea inoculului vegetativ de instalaţie.

3) Cultivarea pe instalaţie în vederea obţinerii de produs finit.

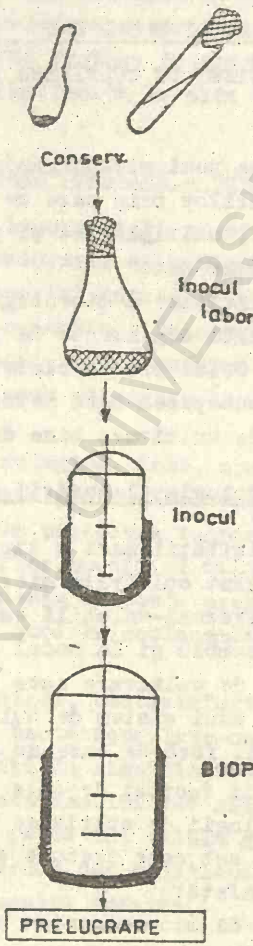


Fig.79. Etapele unui sistem de cultivare microbian.

1. Obţinerea inoculului vegetativ de laborator este etapa în care microorganismul producător este trecut din starea de latenţă în stare de multiplicare activă prin crearea unor condiţii specifice de mediu, agitare şi temperatură. Pe parcursul acestei

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

etape se va urmări obţinerea unei culturi viabile, viguroasă şi cu posibilităţi de multiplicare rapidă.

2. Obţinerea inoculului vegetativ de instalaţie este etapa în care masa microbiană trebuie multiplicată la un raport de 1/10 din capacitatea vaselor de proces. Pe parcursul acestei etape procesul trebuie orientat în aşa fel încît microorganismul producător să-şi dezvolte un potenţial corespunzător etapei de producţie.

3. Cultivarea pe instalaţie în vederea obţinerii de produs finit este etapa în care microorganismul este trecut pe sistemul biotehnologic de producţie, unde are loc procesul propriu-zis. Aici microorganismului trebuie să i se asigure atît condiţii de creştere şi dezvoltare cît şi condiţii de producere a produsului finit de biosinteză.

Pentru creşterea şi dezvoltarea microorganismelor precum şi pentru producerea de substanţe metabolice sînt cunoscute în prezent mai multe tipuri de sisteme de cultivare. Acestea se clasifică în general după mai multe criterii:

A. După modul de derulare a procesului, sistemele de cultivare pot fi:

a) Sisteme de cultivare discontinui.
b) Sisteme de cultivare continui.
c) Sisteme de cultivare sincrone.

B. După necesităţile în aer a microorganismului producător sistemele de cultiva - pot fi:

a) Sisteme aerobe sau agitate.
b) Sisteme anaerobe sau staţionare.

C) După modul în care trebuie cultivat microorganismul se pot distinge:

a) Sisteme de cultivare submerse.
b) Sisteme de cultivare în suprafaţă.

In practica industrială de bază sistemele continui, discontinui şi sincrone sînt universal - valabile, ele putîndu-se aplica la cele mai multe microorganisme, pe cînd celelalte pot fi considerate modalităţi de realizare a cultivării, prin ele urmărindu-se crearea unor condiţii specifice fiecărui microorganism în vederea creşterii şi producerii de substanţe.

2. Sisteme de cultivare discontinui

Sînt cunoscute şi sub numele de sisteme de cultivare batch,

ele sînt acelea în care microorganismul producător îşi parcurge ciclul său de funcţionare după care procesul trebuie oprit, conform schemei din figura 72. Pe parcursul acestui ciclu se pot distinge, cu claritate, mai multe etape specifice evoluţiei unei culturi microbiene.

In cadrul acestui sistem de cultivare intervin o serie de factori care limitează producerea de metaboliţi. Astfel, epuizarea substanţelor nutritive din mediul de cultură şi acumularea de substanţe toxice rezultate din metabolism, fac ca microorganismul producător să-şi diminueze creşterea, multiplicarea şi producerea de produşi sau chiar să-şi întrerupă în cele din urmă aceste activităţi.

In orice sistem de cultivare discontinuă, încă de la declanşarea sa se realizează un surplus de surse nutritive pe baza cărora microorganismul producător îşi derulează propriile sale

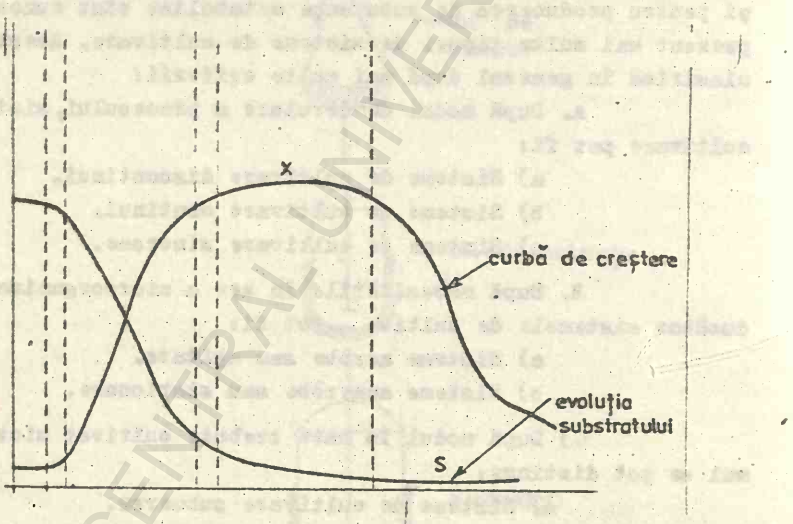


Fig.73. Evoluţia culturii microbiene în raport cu concentraţia substanţelor în sistem de cultivare discontinuă.

procese. Insă, există multe procese microbiene la care asigurarea cu surse nutritive din primele momente ale sale, face ca microorganismul producător să fie supus unor procese de inhibiţie metabolică care se răsfrîng nedorit asupra randamentelor de producţie.

In toate sistemele de cultivare discontinuă între concentraţia substratelor din mediul de cultură şi evoluţia culturii

microbiene se stabilesc corelaţii ce evidenţiază cu claritate că, creşterea culturii microbiene este în strînsă dependenţă de concentraţia acestora (fig.73).

Epuizarea substratului sau substratelor din mediul de cultură, conduce la stagnarea ei, diminuarea producerii de metaboliţi şi în final la moartea producătorului.

3. Sisteme de cultivare continuă

După cum s-a putut constata, într-un sistem de cultivare discontinuu creşterea exponenţială nu poate dura decît o perioadă de timp relativ limitată, de cîteva ore, deoarece sursele nutritive sînt epuizate pînă la atingerea limitelor subnutriţiei celulare.

Înlăturarea acestui impediment a fost posibilă prin concepera de sisteme de cultivare continuă, prin care faza exponenţială se poate prelungi o perioadă îndelungată de timp, zile sau săptămîni.

În astfel de sisteme de cultivare, cultura microbiană poate fi continuu alimentată cu nutrientul sau nutrienţii limitatori ai creşterii, ce face ca procesele biosintetice să se desfăşoare la valori superioare.

Sînt cunoscute în prezent mai multe tipuri de sisteme de cultivare continuă. Unele sînt relativ simple (chemostatul), altele simple dar în mai multe trepte, cu şi fără recirculare, iar altele în mai multe trepte ramificate cu recirculări pe ramificaţii.

3.1. Sistem de cultivare continuă tip chemostat

Acest sistem este forma clasică de cultivare a microorganismelor. El este un sistem de cultivare deschis, în care adăugarea de mediu de cultură proaspăt se face la rate de diluţie relativ constante, în sistem realizîndu-se o continuă amestecare. Volumul total de lichid din sistem este menţinut constant cu dispozitive care permit recoltarea, cu aceeaşi rată a unei părţi din lichidul de cultură. Deci, în cadrul sistemului rata de introducere a mediului proaspăt trebuie să fie egală cu rata de scoatere a lichidului de cultură ce urmează să se prelucreze.

Tempest, în anul 1970 arăta că astfel de sisteme de cultivare se folosesc cînd mediul de cultură prezintă în compoziţia sa mai mulţi nutrienţi limitanţi, dintre aceştia însă unul singur

are efect limitator strict.

Instalaţiile de cultivare continuă tip chemostat sînt relativ simple (fig.74), dar ele trebuie astfel concepute încît să asigure o serie de condiţii cum ar fi:

1) Cultura trebuie să fie închisă într-un spaţiu steril pentru a se evita contaminarea.

2) Să ofere posibilităţi de modificare a ratei de diluţie, deci să prezinte dispozitive de reglare a debitului de mediu ce urmează să fie introdus în sistem.

3) Să ofere posibilităţi de menţinere constantă a volumului culturii.

4) Cultura să fie suficient de agitată, astfel încît fluxul de mediu introdus în cultură să fie dispersat instantaneu şi omogen.

5) Să ofere posibilităţi de păstrare a oxigenului solvit la nivele superioare, fără a se limita creşterea şi producerea de metaboliţi.

6) Să ofere posibilităţi de reglare şi control al parametrilor tehnologici (temperatură, pH, oxigen solvit, CO_2, etc.).

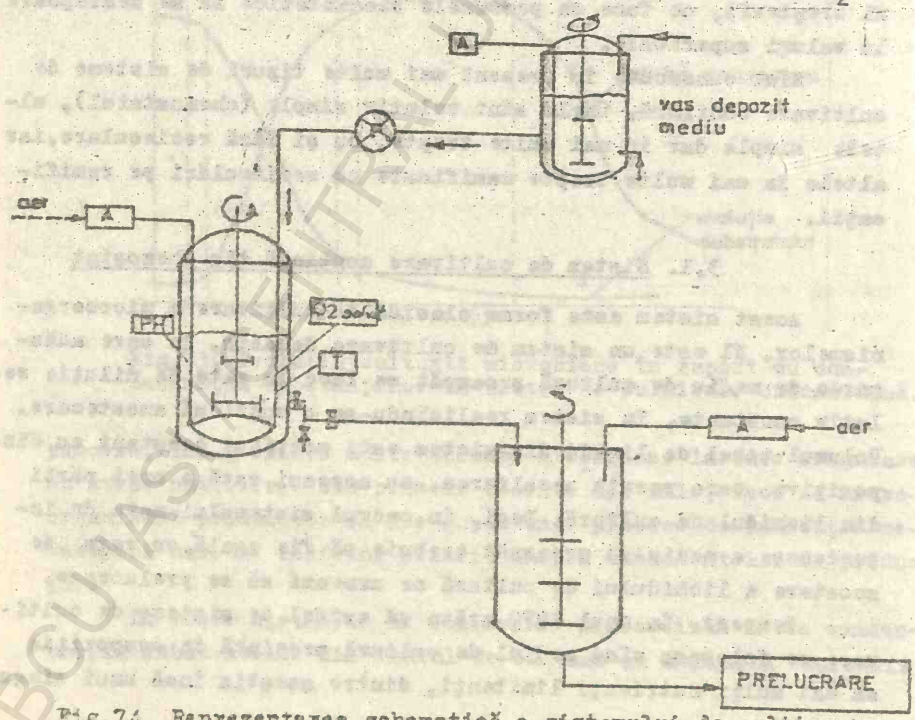


Fig.74. Reprezentarea schematică a sistemului de cultivare continuă tip chemostat.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

In toate sistemele de cultivare continuă tip chemostat rata de creştere a microorganismului producător trebuie să fie funcţie atît de fluxul de mediu, deci de rata de diluţie, cît şi de posibilităţile de utilizare a substratului. De exemplu, un microorganism va creşte mult mai accelerat într-un bioreactor de 1 ℓ capacitate, la o rată a fluxului mediu de 1 ℓ/h, decît într-un bioreactor de 10 ℓ capacitate, cînd rata fluxului de mediu este tot de 1 ℓ /h. Acest lucru se poate calcula folosind următoarea relaţie:

$$D = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

unde: D = rata de diluţie;

μ_{max} = rata maximă de creştere;

S = concentraţia substratului;

K_s = constantă de saturare a substratului.

Dacă rata de creştere a microorganismului este controlată prin rata de diluţie, atunci ea ar putea fi ajustată între anumite limite, la valorile dorite de producător. Totuşi, rata specifică de creştere nu trebuie să depăşească μ_{max} şi deci condiţiile stării constante nu pot fi obţinute la rate de diluţie dispuse în jurul valorii critice (D_c). D_c are întotdeauna valori apropiate sau egale cu μ_{max}. Dacă rata de diluţie este fixată la valori mai mari ca D_c cultura va fi înlăturată progresiv din bioreactor, fapt ce determină oprirea procesului.

3.2. Sisteme de cultivare continuă în mai multe trepte neramificate

Sistemele de cultivare continuă în mai multe trepte sînt sistemele prin intermediul cărora se poate realiza o distribuire temporară a fazelor, astfel încît să se realizeze omogenizarea culturii.

Ricica, în anul 1970 arăta că sistemele continui de cultivare în mai multe trepte nu sînt altceva decît sisteme formate din mai multe bioreactoare montate în aşa fel încît să permită schimbări în omogenizarea lichidelor lor, la volume egale sau inegale (fig.75).

Numărul bioreactoarelor ce intră în componenţa sistemului ar trebui să fie de cel puţin două sau „n". Volumul F_i de mediu curge în primul bioreactor din acesta este trecut în următorul

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

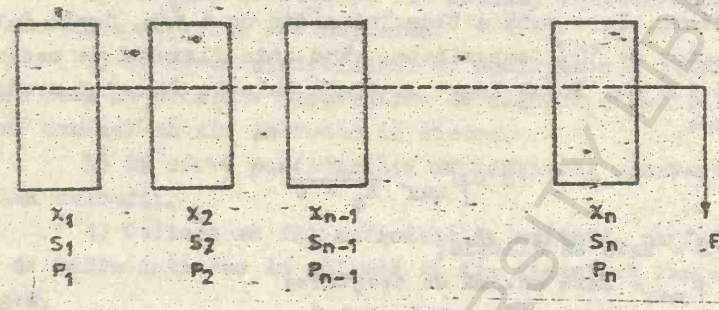


Fig.75. Reprezentarea schematică a unui sistem de cultivare continuă în mai multe trepte neramificate.
S = substrat; F_1 = flux de introducere a mediului; F_e = flux de evacuare a culturii; X_1, X_2, X_{n-1}, X_n = concentraţia celulelor pe trepte; S_1, S_2, S_{n-1}, S_n = concentraţia substratului pe trepte; P_1, P_2, P_{n-1}, P_n = produşi rezultaţi.

şi apa mai departe, astfel încît volumul final să fie acelaşi în toate treptele. Acest lucru se poate reda prin relaţia:

$$F = D_1V_1 = D_2V_2 \ldots\ldots\ldots D_nV_n$$

unde F = fluxul de mediu; D = rata de diluţie; V = volumul culturii.

În cazul acestor sisteme rata de diluţie D, în diferitele bioreactoare, este dependentă de volumul lichidului de cultură din ele.

Deci:

$$D = \frac{F}{V} \quad (h^{-1})$$

Pentru exemplificare prezentăm un sistem de cultivare continuă în două trepte în care concentraţia celulelor pe trepte este X_1 şi X_2, iar concentraţia substratelor este S_1 şi S_2.

Întrucît atît celulele cît şi substratul utilizat pentru prima treaptă se scurge în treapta a II-a, ecuaţia de măsurare a celulelor în starea creşterii constante a treptei a II-a este următoarea:

ourgere + creştere ⟶ flux eliminat

sau

$$D_2X_1 + \mu_2X_2 = D_2X_2$$

iar ecuaţia de măsurare a substratului este:

$$D_2S_1 - \frac{\mu_2X_2}{X_2} = D_2S_2$$

Si în această situaţie rata specifică de creştere μ_2 depinde de K_s şi de concentraţia substratului limitator S.

Deci:

$$\mu_2 = \mu_{max} \cdot \frac{S_2}{K_s + S_2}$$

Acum cantitatea de microorganisme din treapta a doua este dependentă de coeficientul de producţie, X_2, care exprimă eficienţa utilizării substratului prin producerea de masă celulară.

Atunci:

$$\mu_2 = \frac{D_2(X_2 - X_1)}{X_2}$$

Insă, $X_2 - X_1 = Y_2(S_1 - S_2)$.

Inlocuind în formula de mai sus aceste valori se va obţine relaţia:

$$\mu_2 = \frac{D_2Y_2(S_1 - S_2)}{X_2}$$

In raport cu aceasta se poate face aprecieri asupra randamentului sau coeficientul de producţie. Valorile sale se modifică în raport cu descreşterea substratului limitator şi acumularea de produşi de metabolism.

3.3. Sisteme de cultivare continuă în mai multe trepte ramificate

Prin modificarea sensului de ourgere a fluxului de lichid într-un sistem de cultivare în mai multe trepte se pot obţine diferite tipuri de sisteme în mai multe trepte, dar ramificate, cu funcţionare continuă sau eşalonată pe ramificaţii (fig. 76. a şi b).

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

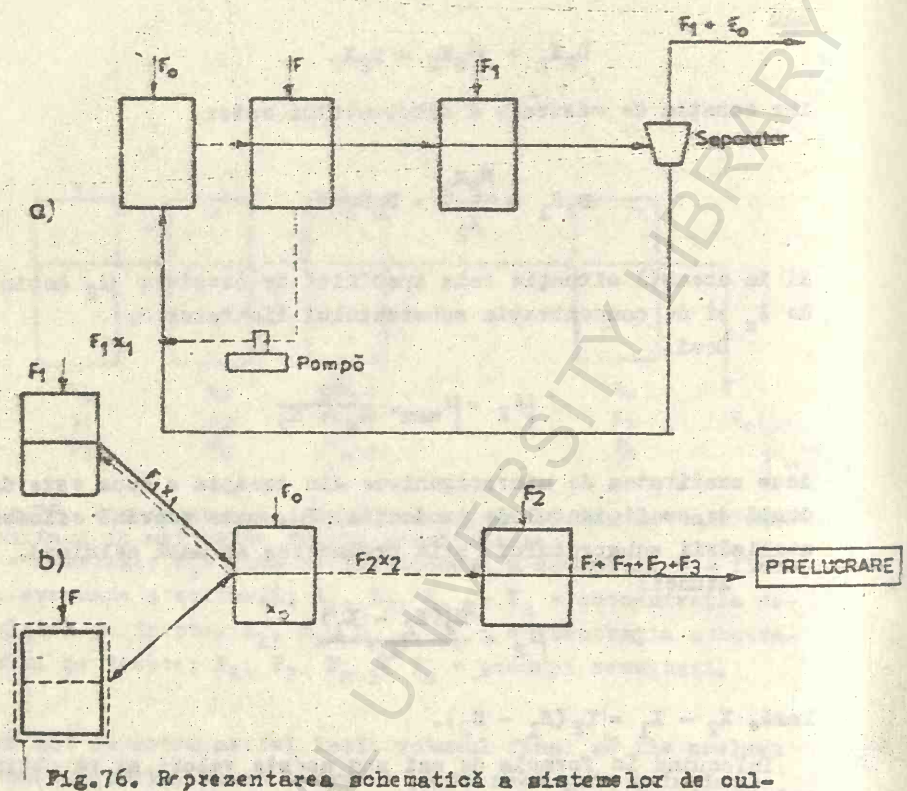


Fig.76. Reprezentarea schematică a sistemelor de cultivare continuă ramificate în mai multe trepte.

Mediul proaspăt poate fi stocat în F_1 sau F_0 sau în oricare treaptă a sistemului. Treapta a II-a este continuu inoculată de treapta precedentă prin fluxul F_1X_1.

Cantitatea de microorganisme, X_1, ce urmează să intre în treapta a II-a este diluată pînă ce suma totală a fluxului atinge concentrația X_0. Aceasta se poate exprima astfel:

$$X_0 = \frac{F_1X_1}{F_1 + F_0}$$

Dar pentru menținerea stării constante trebuie ca:

aprovizionarea + dezvoltarea = randamentul de producție

sau:

$$D_2X_0 + \mu_2X_2 = D_2X_2$$

BUCUREȘTI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

unde: $D_2 = (P_1 + P_o) \cdot V_2$

Dacă D_2 se va menţine la valoarea obţinută prin calcul, cu formula de mai sus, procesul va decurge echilibrat fără modificări în concentraţia celulelor şi randamentul de producţie.

4. Sisteme de cultivare sincronă

In cazul culturilor microbiene obişnuite, diviziunile celulelor individuale urmează ritmuri proprii, în aşa fel încît rezultă o populaţie heterogenă, formată din indivizi aflaţi, practic, în toate fazele ciclului lor de creştere şi multiplicare. Astfel de culturi sînt cunoscute în literatura de specialitate sub numele de culturi asincrone.

Chiar în cazul în care se porneşte de la o celulă (clonă), se constată că la descendenţi, după mai multe diviziuni sincrone, apar diferenţe, aceasta ca urmare a multiplicării celulelor culturii la momente diferite (asincronism).

Pentru a se evita apariţia de celule în forme diferite de creştere s-a conceput sistemele sincrone, acestea oferind posibilitatea obţinerii unor microorganisme foarte asemănătoare ca vîrstă, dimensiuni şi productivitate. Toate celulele obţinute pe această cale se divid simultan sau aproape simultan (sincron).

Sînt cunoscute în prezent mai multe tehnici şi metode de obţinere a unui sistem de cultivare sincron. Dintre acestea cele mai importante sînt:

a) Tehnici bazate pe selecţia microorganismelor după dimensiuni de vîrstă.

Această tehnică ţine seama de modificările ciclului de diviziune în raport cu care se vor alege celulele cele mai mici din populaţie pornindu-se de la premiza că celula „nou-născută" are dimensiunea cea mai mică.

Tehnica prezintă mai multe variante :

1 - Filtrarea printr-un teanc de hîrtie de filtru pe care cele celulele de dimensiuni mari vor fi reţinute de straturile de hîrtie pe cînd cele mici vor trece prin filtru în lichidul filtrant de unde pot fi preluate şi folosite la realizarea culturii sincrone.

2 - Separarea prin centrifugare. Tehnica constă în centrifugarea unei culturi în gradienţi de densitate diferiţi

(sucroză sau dextroză). Această tehnică se aplică în special levurilor la care celulele mici, la începutul ciclului de diviziune, sedimentează mai lent şi pot fi separate din stratul superficial al centrifugatului.

3 - Separarea prin filtrarea pe filtre de membrană a unei culturi aflate în faza exponenţială de creştere, urmată de recuperarea celulelor rezultate din prima diviziune. Tehnica se bazează pe principiul că în cursul filtrării unele celule sînt legate lax în porii filtrului şi pot fi îndepărtate prin spălare, în timp ce altele rămîn legate stabil de structura filtrului (în pori) unde se divid pentru ca apoi să se desprindă de celula mamă, trecînd în filtrat. Deci prin această tehnică se recuperează celulele „nou-născute" care se vor divide apoi sincron 2-3 generaţii.

b) Tehnici bazate pe modificări ale mediului şi condiţiilor de cultivare. În categoria lor intră:

1. Tehnica expunerii microorganismului de bază la o perioadă de înfometare, în medii fără un factor de creştere esenţial, înainte de a fi trecut într-un mediu complet. Tot în aceeaşi categorie de tehnici intră şi expunerea la doze subletale de radiaţii, expunerea la acţiunea unui antibiotic care inhibă sinteza proteinelor (cloramfenicolul), expunerea alternativă sau repetată la temperaturi optime, suboptimale şi supraoptimale (fig.77).

Deşi în cele mai multe cazuri s-au obţinut rezultate satisfăcătoare, totuşi mecanismul de acţiune a acestor factori este încă necunoscut. Probabil că factorul ce acţionează asupra culturii modifică sincronizarea sintezei unuia sau mai multor compuşi care declanşează procesul de diviziune celulară, atunci cînd ele ating o anumită concentraţie în celulă. Efectele temperaturii s-ar explica prin aceea că în ciclul de diviziune celulară ar exista o etapă sensibilă la temperatură ce face ca în momentul şocului termic diviziunea să fie oprită oferind posibilitatea membrilor populaţiei întîrziaţi în creştere să-i ajungă din urmă pe cei care au ajuns deja la multiplicarea optimă.

Metoda expunerii la temperatură este destul de dificilă deoarece temperatura necesară pentru creşterea sincronă trebuie determinată empiric pentru fiecare microorganism în parte.

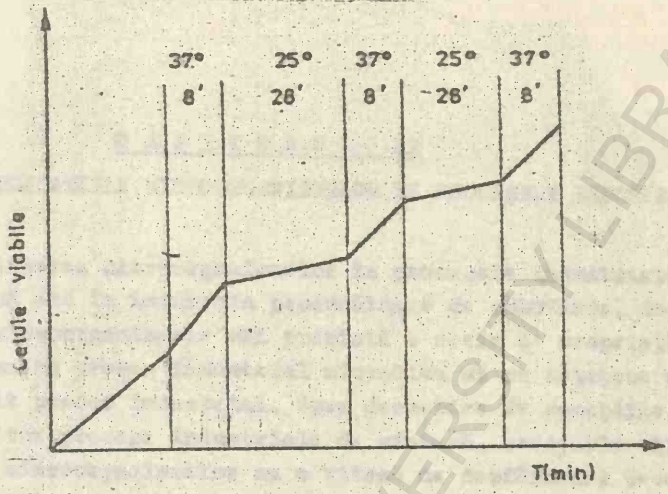


Fig.77. Sincronizarea creşterii unei culturi prin expunerea alternativă la diferite temperaturi.

In funcţie de natura tehnicilor utilizate Rowbury (1972) deosebeşte două categorii distincte de culturi:

1) culturi sincrone în care toate microorganismele se divid în acelaşi timp, deoarece de la început au fost selecţionate celule cu vîrsta şi dimensiuni asemănătoare;

2) culturi sincrone care au fost aduse în acelaşi stadiu de diviziune prin tratamente fizice şi chimice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL IX

IMPLICATIILE MICROORGANISMELOR IN PROCESELE INDUSTRIALE

Utilizarea microorganismelor în procesele industriale a deschis o nouă eră în industria producătoare de substanţe. Aceasta, deoarece microorganismele vii prezintă o serie de proprietăţi care fac ca un proces industrial microbian să se detaşeze net de oricare alt proces industrial. Spre deosebire de reacţiile specifice multor procese industriale de sinteză, reacţiile chimice specifice microorganismelor au o viteză de desfăşurare deosebit de mare, ceea ce face ca procesele de sinteză să se deruleze extrem de rapid. Un proces industrial desfăşurat cu atîta rapiditate necesită mecanisme de control de înaltă acurateţe, ceea ce microorganismele realizează fără echivoc.

Microorganismele ca agenţi biologici ai unui proces industrial sînt principalii producători ai multor substanţe de interes medical, alimentar, energetic sau industrial (tabelul 7).

Tabelul 7

Clasificarea schematică şi domeniul de utilizare a principalelor produse microbiene obţinute pe cale industrială (după Sasson, 1988)

Tehnologia de obţinere	Domeniul de utilizare				
	Sănătate	Industria alimentară	Agricultură	Energie	Industria chimică
0	1	2	3	4	5
Biosinteză	Antibiotice Vitamine Enzime Aminoacizi Nucleotide Steroizi Alcaloizi Anticorpi	Ac.citric Aminoacizi Nucleotide Enzime Proteine monocelulare	Biopesticide	Etanol Acetonă Butanol Biogaz	Etanol Etilenă Acetaldehidă Acetonă Butanol Butadienă

Tabelul 7 (continuare)

0	1	2	3	4	5
Inginerie enzimatică		Izoglucoză Sirop de glucoză		Etanol	
Recombinare genetică sau inginerie genetică	Interferon Vaccinuri Anticorpi monoclonali	Proteine monoclonale	Cloni	-	-

Multe dintre biotehnologiile care au la bază microorganismele pot înlocui unele tehnologii chimice poluante şi mai puţin rentabile. De exemplu, în industria chimică sinteza unor substanţe aromate şi de stimulare a gustului , apoi producerea maselor plastice şi a produselor pentru industria textilă, se pot obţine prin aplicarea la scară industrială a unor biotehnologii microbiene. La fel în domeniul energetic : etanolul, metanolul, biogazul şi hidrogenul se pot obţine tot pe cale microbiană. In domeniul biometalurgiei microorganismele se pot folosi la extracţia unor metale, iar în domeniul petrochimiei microorganismele joacă deja un important rol în extracţie.

După cum se poate constata, biotehnologiile microbiene pot , pe de o parte, să înlocuiască unele tehnologii industriale poluante şi mai puţin productive , iar pe de altă parte , pot să devină activităţi industriale de bază a multor ţări cu tehnologii avansate.

Industria biotehnologică este posibil şi trebuie să devină una dintre principalele ramuri în următoarele domenii :

1) industria alimentară, ea poate să devină principala sursă de obţinere a proteinelor cu înaltă valoare nutritivă prin cultivarea levurilor, algelor şi bacteriilor, , apoi ea ar putea deveni mare producătoare de acizi aminici, vitamine şi enzime;

2) industria farmaceutică , biotehnologiile pot fi folosite la sinteza de hormoni, interferon şi antibiotice;

3) protecţia mediului şi lupta împotriva poluării, biotehnologiile pot fi principale modalităţi de tratare a apelor uzate şi transformate a resturilor menajere, de compostare a deşeurilor şi fabricare a compuşilor biodegradabili.

Produşii de biosinteză ai microorganismelor pot fi metaboliţi primari, metaboliţi secundari, enzime polizaharide, precum şi proteine monocelulare (SCP).

1. Obţinerea de metaboliţi primari

Metaboliţii primari sînt compuşi cu greutate moleculară mică (1.500 daltoni) necesari dezvoltării microorganismului. Unii dintre aceştia sînt monomeri macromoleculari, în timp ce alţii servesc la sinteza coenzimelor.

Cei mai importanţi metaboliţi primari ce pot fi produşi pe cale industrială cu ajutorul microorganismelor sînt: aminoacizii, acizii organici, nucleotidele purinici şi pirimidinice, solvenţi organici (etanol, butanol, acetonă, propanol) şi vitaminele.

Celula microbiană în condiţii normale, nu produce cantităţi excesive de metaboliţi primari, ci numai atît cît este nevoie pentru propriile sale procese celulare. Insă, în anumite condiţii de dezvoltare sau prin tehnici de genetică şi inginerie genetică, s-au creat tulpini care sînt capabile să producă în exces astfel de substanţe.

- Obţinerea de aminoacizi

Aminoacizii sînt produşi prin biosinteză de către unele microorganisme auxotrofe, a căror metabolism nu mai răspunde proceselor de reglare enzimatică.

Obţinerea celor mai mulţi aminoacizi prin procese de biosinteză microbiană prezintă, faţă de procesele de sinteză chimică un avantaj apreciabil, deoarece obţinerea lor nu se mai face sub formă de izomeri. Este cunoscut că prin procese chimice aminoacizii se obţin numai sub formă de izomeri (L-D-aminoacizi), ce sînt greu de separat, iar prin separare producţia se reduce la jumătate. De aceea, în prezent se urmăreşte biotehnologizarea producerii celor mai importanţi aminoacizi.

Pe cale microbiană este bine pusă la punct producerea lizinei, acidului glutamic, serinei, asparaginei, glicocolului, alaninei, cistinei, metioninei, etc.

Lizina este un aminoacid esenţial cu largă utilizare în industria alimentară şi zootehnie. El se obţine pe cale microbiană cu ajutorul unor tulpini bacteriene cum ar fi: Brevibacterium flavum şi Corynebacterium glutamicum. Lizina ca aminoacid

esenţial se produce în prezent pe cale microbiană în proporţie de 80 %, restul de 20 % obţinîndu-se pe cale chimică.

Pe lîngă lizină, în prezent se produce şi acidul L-glutamic, sub formă de glutamat de sodiu. El este produs de bacteria Corynebacterium glutamicum şi Brevibacterium flavum. Producţia anuală se cifrează la aproximativ 360.000 - 400.000 t , produsul avînd o mare utilizare în industria alimentară la evidenţierea gustului alimentelor. De exemplu, în SUA, în anul 1980 se consuma în acest scop aproximativ 30.000 t.

Substratul de biosinteză a acidului glutamic este glucoza, dar se pot folosi şi n-parafinele, acidul acetic etc. Se presupune că acidul acetic ar fi chiar un substrat mai bun decît glucoza, deoarece lasă mai puţine reziduuri după metabolizare, complicînd mai puţin procesul de biosinteză.

Procesul de biosinteză este stimulat în mod benefic dacă bacteria producătoare este cultivată într-un mediu de cultură deficitar în biotină (aceasta trebuie să fie sub limita optimă). Acest deficit face ca biosinteza fosfolipidelor membranare să fie deficitară şi în felul acesta glutamatul poate traversa membrana celulară mai uşor, acumulîndu-se în mediul de cultură.

Dezvoltarea biotehnologiei în viitor va trebui să urmărească extinderea producţiei industriale în special de lizină, metionină, serină, valină, asparagină, alanină, glicocol, etc., atît pentru procurarea de materii prime pentru industria alimentară, furajeră cît şi pentru alte domenii de interes economic. Pe plan mondial, încă din perioada anilor '80 s-a constatat că necesităţile sînt din ce în ce mai mari. Astfel, necesarul în glicocol, alanină, cistină, etc., pentru industria de prelucrare a unor alimente şi pîinii a devenit o realitate. Prin adăugarea de glicocol şi alanină alimentele devin mai aromate, iar adăugarea de cistină la prelucrarea pîinii conduce la ameliorarea texturii şi proprietăţilor gustative a ei. Mai mult, aminoacizii şi-au găsit domenii de aplicare şi în medicină, la tratarea unor afecţiuni gastrice şi hepatice.

- Obţinerea de acizi organici

Acizii organici ca produşi ai metabolismului primar al microorganismelor au trezit un interes deosebit fabricanţilor, datorită faptului că se obţin pe această cale în forme mult mai pure şi avantajoase din punct de vedere economic. Dintre toţi acizii organici cunoscuţi se obţin în prezent pe cale microbiană acidul acetic, citric şi lactic.

- Acidul acetic, este acidul organic cel mai uzitat pe plan industrial; el serveşte la fabricarea cauciucului, a materialelor plastice, a fibrelor de acetat, a substanţelor farmaceutice, a insectividelor, etc. In Japonia acidul acetic se foloseşte ca substrat de biosinteză în obţinerea de aminoacizi (acid glutamic, lizină).

Acidul acetic se poate obţine pe cale microbiană prin simpla reducere a alcoolului etilic, folosindu-se bacteriile acetice. Această cale însă nu este rentabilă decît în cazul fabricării oţetului de uz alimentar. In prezent sînt cunoscute alte căi de obţinere a acidului acetic. Una dintre acestea este calea prin care materialele celulozice sînt transformate cu ajutorul ciupercilor celulozolitice la glucoză, care la rîndul său este convertită de alte forme microbiene, în special bacterii, la etanol şi acid acetic. Un interes deosebit au trezit în această direcţie bacteriile termofile acetice.

Unele bacterii cum ar fi: Clostridium aceticum şi Acetobacter woodii sînt capabile să transforme bioxidul de carbon şi hidrogenul în acid acetic.

- Acidul citric ca produs al metabolismului primar este biosintetizat de o serie de microorganisme , în special fungi. Astfel, Aspergillus niger cultivat pe un mediu de cultură cu melasă, produce cantităţi apreciabile de acid citric. Acesta este un mutant a cărui cale de metabolizare a glucozei se opreşte la acidul citric care se acumulează în mediul de cultură fără a mai parcurge etapele tipice ciclului Krebs.

La nivelul anului 1980 producţia mondială de acid citric se ridica la 175.000 t avînd o valoare de 59 milioane de dolari.

- Acidul lactic. Este un acid organic cu largă utilizare în industria alimentară. El este utilizat însă şi în industria textilă drept coroziv şi în industria de prelucrare a maselor plastice în electrolustruirea lor. A fost primul acid organic produs prin biosinteză microbiană. In SUA şi Europa producţia anuală se cifra la nivelul anului 1980 la 40.000 t avînd o valoare de 56 milioane dolari. El este produs de Lactobacillus delbrueckii care converteşte glucoze la acid lactic printr-un proces fermentativ - fermentaţia lactică.

- Obţinerea de vitamine

Vitaminele ca produşi ai metabolismului primar, se obţin cu succes cu ajutorul microorganismelor. Prin tehnici biotehnologice şi de genetică microbiană, s-a reuşit să se obţină produ-

tori înalt productivi. Astfel, Ashbya gossyppii modificată genetic produce de peste 2000 de ori mai multă riboflavină decît tulpina naturală, în timp ce Pseudomonas denitrificans modificată tot pe cale genetică produce de aproximativ 50.000 ori mai multă vitamină B_{12} decît necesităţile sale metabolice.

Prin procese de biosinteză, industrial, se produc în prezent un număr relativ limitat de vitamine sau precursori ai acestora (Tabelul 8). Este binecunoscută în prezent producerea la scară industrială a vitaminei B_2 şi B_{12}.

Tabelul 8

Principalele vitamine obţinute prin procese de biosinteză cu ajutorul microorganismelor

Vitamina/ precursor	Tulpina microbiană	Substrat nutritiv	Randament de producţie
Beta-caroten (precursor vit.A)	Mycobacterium smegmatis	Melasă, ulei soia şi tiamină	1 g/l
B_2 (riboflavină)	Ashbya gossyppii	glucoză, colagen, ulei soia, glicină	4,25 g/l
L-sorboză (precursor vit.C)	Acetobacter suboxidans	D-sorbitol, extract de porumb.	70 %
Acidul 5-cetogluconic (precursor vitamina C)	Acetobacter suboxidans	glucoză, $CaCO_3$, extract de porumb.	100 %
Vitamina B_{12}	Propionibacterium shermani	glucoză, extract de porumb, Co, NH_3	30 mg/l
	Pseudomonas denitrificans	acid oxalic, betaină, Co	10 mg/l

- Vitamina B_2. In producerea vitaminei B_2 un rol important îl joacă mediul de cultură. S-a constatat că atunci cînd se utilizează glucoza ca sursă de carbon, randamentele sînt apreciabile, în schimb cînd se utilizează zaharoza sau maltul, producţia este evident diminuată, iar randamentele de producţie sînt scăzute. Adăugarea fracţionată a sursei de carbon, conduce la creşterea randamentului de producţie şi utilizarea mai eficientă a substratului.

- Vitamina B_{12} este vitamina cu cea mai largă utilizare în

domeniul medical, ea fiind unul dintre medicamentele importante în tratarea anemiilor şi a unor boli de nutriţie. Din aceste considerente producţia mondială este în continuă creştere, cu axare preponderentă pe producerea ei prin biosinteză.

Prin procese de biosinteză vitamina B_{12} se produce în prezent cu tulpini bacteriene aparţinînd genului Propionibacterium şi Pseudomonas. Toate procesele industriale care au la bază microorganismele, necesită ca factor important al mediului de cultură ioni de Co şi un control strict al concentraţiei acestuia pe tot parcursul procesului de biosinteză.

- Obţinerea de alcooli

Alcoolii se pot obţine cu ajutorul microorganismelor prin procese de fermentaţie alcoolică. Cel mai important produs al fermentaţiei alcoolice este etanolul.

Etanolul este obţinut industrial cu levuri din genul Saccharomyces sau unele bacterii cum ar fi Bacillus macerans, Sarcina ventriculi, etc.

In ultimul timp se utilizează în vederea obţinerii alcoolului etilic celule imobilizate de Zymomonas mobilis. Celulele acestui microorganism imobilizate pe fibre de bumbac pot produce industrial alcool etilic mult mai eficient, înlăturîndu-se unul dintre impedimentele cele mai stresante a unor astfel de procese -toleranţa de către microorganismul producător a unor concentraţii ale produsului finit în continuă creştere. Este cunoscut că microorganismele tolerează concentraţii relativ limitate de alcool etilic în mediul de cultură. Limitele tolerante s-ar dispune în jur de 10 - 12 g %. Peste aceste limite procesele biosintetice sînt inhibate iar producţia diminuată.

Alcoolul etilic de origine microbiană se poate obţine prin fermentarea unor substanţe amidoncase (cartofi, porumb, orz, secară), unele materii prime zaharoase (trestie de zahăr, sfeclă, mango, melasă, leşii sulfitice, etc.) sau unele materiale celulozice (lemn sau stuf). Din proces poate să rezulte pe lîngă alcool etilic acetaldehidă, acizi organici volatili, glicerină şi chiar unii alcooli superiori. Acest amestec de substanţe este supus unor procese de fracţionare din care rezultă spirt brut şi produşii semnalaţi. Spirtul brut este rafinat şi rectificat obţinîndu-se în final alcoolul etilic pur.

Producerea alcoolului etilic este într-o continuă creştere, creştere datorată în mare parte de creşterii preţului petrolului

pe plan mondial, dar şi utilizării sale din ce în ce mai mult ca combustibil. Există ţări în lume la care producerea pe cale microbiană este o problemă naţională. De exemplu, Brazilia este cea mai mare producătoare de alcool etilic prin biosinteză din lume.

- n-Butanolul este şi el obţinut pe cale microbiană prin procese fermentative. Microorganismele capabile să realizeze fermentaţii care au ca produs finit n-butanolul sînt bacteriile sporulate anaerobe din genul Clostridium (Cl. acetobutyricum şi Cl. saccharoacetobutyricum) şi Bacillus (B. polymixa).

n-Butanolul este unul dintre alcoolii larg utilizaţi în industria la fabricarea plastefianţilor, uleiurilor de frînă, a văginelor pe bază de uree, a agenţilor de extracţie şi a adjuvanţilor benzinei.

Din cele mai multe procese industriale care au la bază microorganismele, rezultă din proces un amestec de n-butanol şi acetonă. Butanolul se poate folosi la sinteza butadienei, iar acetona se poate folosi în obţinerea unor explozivi.

Toate procesele de obţinere a n-butanolului cu ajutorul microorganismelor, ca şi în cazul obţinerii etanolului, prezintă un impediment de care trebuie să se ţină cont: toleranţa de concentraţii limitate de produs finit de către microorganismul producător. Cercetările actuale urmăresc creearea prin tehnici de genetică şi ingineria genetică de microorganisme care să tolereze concentraţii în creştere a produsului finit. În plus tehnicile de imobilizare a celulelor microorganismului producător oferă noi şanse de creştere a producţiei şi eficienţei procesului.

2. Obţinerea de metaboliţi secundari

Metaboliţii secundari, cunoscuţi şi sub numele de idioliţi sînt compuşi cu greutate moleculară redusă care nu sînt indispensabili creşterii şi dezvoltării microorganismelor. Ei sînt produşi de grupe taxonomice restrînse şi constau adesea dintr-un amestec de compuşi cu structură asemănătoare, aparţinînd aceleiaşi familii chimice.

În categoria metaboliţilor secundari intră: antibioticele, alcaloizii, hormonii de creştere (giberelinele) şi toxinele.

Microorganismele care produc metaboliţi secundari au o fază iniţială de creştere rapidă, trofofaza, pe parcursul căreia sinteza substanţelor secundare este neglijabilă şi o fază de sinteză a metabolitului secundar, idiofaza. Pe parcursul acesteia, creşte-

rea este încetinită, procesele celulare limitîndu-se la sinteza ideolitului.

- Obținerea antibioticelor

Antibioticele formează grupa cea mai importantă de metaboliți secundari ce se pot obține cu ajutorul microorganismelor. În categoria lor sînt incluse și o serie de substanțe antifungice, antitumorale și alcaloizii.

Antibioticele sînt produse în prezent de șase genuri de microorganisme, ele aparținînd atît bacteriilor cît și fungilor. Aceste microorganisme produc în jur de 1500 antibiotice diferite din punct de vedere chimic și al acțiunii lor antimicrobiene.

Fungii cei mai producători de antibiotice aparțin genurilor: Penicillium și Cephalosporium.

Genul Penicillium produce întreaga gamă de peniciline cunoscute în prezent, iar genul Cephalosporium produce antibioticele din categoria cefalosporinelor. Numărul antibioticelor produse de aceste genuri se apreciază că ar fi de aproximativ 1000.

Bacteriile sînt și ele importanți producători de antibiotice. Astfel, specii aparținînd genului Bacillus produc în jur de 500 antibiotice, în timp ce bacteriile filamentoase (actinomicetele) produc peste 3000 antibiotice diferite din punct de vedere chimic. Din categoria bacteriilor filamentoase cei mai mari producători de antibiotice aparțin genului Streptomyces.

Producția mondială de antibiotice la nivelul anului 1981 era de aproximativ 25.000 tone, dintre care circa 17.000 tone de penicilină, 5000 tone de tetraciclină, 1.200 tone cefalosporine și 800 tone eritromicină.

Începînd cu anii '60 ai secolului nostru cercetările și programele s-au orientat spre obținerea unor antibiotice de semisinteză, aceasta ca urmare a rezistenței căpătate de multe microorganisme patogene la antibioticele tradiționale. Este cunoscut că microorganismele patogene au capacitatea metabolică de a produce unele enzime, cum ar fi cele din categoria penicilinazelor, care fac inofensivă acțiunea antibioticului. Prin modificarea structurii chimice a antibioticelor asupra cărora acționează aceste enzime, s-a reușit obținerea de noi produși cu acțiune antibiotică, inofensive atacului enzimatic.

Primele modificări chimice s-au făcut la antibioticele din grupa penicilinelor și cefalosporinelor. Prin adăugarea unei grupări, de exemplu metoxil (CH_3O -) la nucleul β - lactamic, con-

duce la obţinerea unei cefalosporine rezistentă la atacul enzimatic microbian. In cazul penicilinei grupul benzil al acesteia este detaşat de moleculă cu ajutorul unor acilaze, produse de unele bacterii şi care au posibilitatea metabolică de a structura produsul: acidul 6-aminopenicilanic (6-APA). Acest acid este un antibiotic slab, dar el prezintă o structură foarte comodă pentru fixarea de grupări chimice laterale ce duc la creşterea activităţii lor antibiotice. Pe această cale s-a obţinut ampicilina, oxacilina sau alte antibiotice de semisinteză rezistente la atacul enzimatic prin penicilază.

In ultimul timp, în Germania s-a descoperit o nouă clasă de antibiotice beta-lactamice, thienamicinele, produse de Streptomyces cattleya. Aceste antibiotice sînt foarte eficiente împotriva bacteriilor Gram-pozitive şi Gram-negative şi au capacitatea de a inhiba activitatea beta-lactamazelor.

Tulpinile actuale de antibiotice au fost aduse la un înalt potenţial productiv prin numeroase cicluri de mutaţii şi selecţii. Pe parcursul fiecărui ciclu cultura tratată cu substanţa mutagenă, a fost supusă mai multor teste de productivitate, reuşindu-se în final să se obţină mutantul de înaltă productivitate.

Aceasta la rîndul său poate să constituie punctul de plecare în noi cercetări de mutageneză şi selecţie pînă la obţinerea celei mai productive forme.

In ultimul timp tehnicile de mutageneză au fost înlocuite cu tehnici mai moderne de inginerie genetică, un rol important jucîndul recombinarea genetică. Transferul de gene prin metode de ingimerie genetică a condus la obţinerea unor antibiotice noi mult mai eficiente în atacul microbian.

- Obţinerea de substanţe antifungice

Deşi numărul ciupercilor patogene este într-o continuă creştere numărul substanţelor antifungice este relativ limitat. Puţine sînt microorganismele producătoare de substanţe antifungice; ele se reduc în prezent la unele streptomicete: stamicinul, produs de Streptomyces nursei, cicloheximidele, produse de Streptomyces griseus, griseofulvinele, produse de Penicillium griseofulvum, polimixinele, produse de diferiţi reprezentanţi ai genului Streptomyce, etc.

Dintre toate acestea cicloheximidele au domeniul cel mai larg de acţiune, ele avînd efect asupra celor mai multe ciuperci. Acţiunea lor se manifestă prin blocarea sintezei proteinelor, distrugînd ribozomii.

In prezent există ample preocupări pentru descoperirea şi a altor antibiotice antifungice.

- Obţinerea de substanţe antitumorale

Arsenalul substanţelor antitumorale de origine microbiană este destul de restrîns. Sînt produse în prezent pe cale biotehnologică cu ajutorul microorganismelor două substanţe antitumorale utilizate deja în practica medicală: bleomicina şi anthraciclina.

Bleomicina este produsă de actinomicetul, Streptomyces verticillus care a fost descoperit de Umezawa şi colaboratorii săi de la Institutul de chimie microbiană din Tokio.

Bleomicina este o glucopeptidă a cărei acţiune constă în clivarea ADN-ului celular tumoral şi în inhibarea replicării ADN şi ARN.

Anthraciclina este o substanţă antitumorală compusă dintr-un aminoglicozid şi o moleculă de anthraciclină. Mecanismul său de acţiune nu este încă cunoscut.

Atît bleomicina cît şi anthraciclina se pot utiliza în mod limitat în tratarea diferitelor forme de cancer, datorită leziunilor pe care le produc la nivelul muşchiului cardiac.

- Obţinerea de alcaloizi

Majoritatea alcaloizilor de interes medical se obţin din plantele superioare. Ei pot fi produşi însă şi de unele ciuperci, cum ar fi Claviceps purpurea sau Claviceps paspali.

Claviceps purpurea parazitează pe cornul secarei, alcaloizii produşi acumulîndu-se aici, de unde prin diferite metode chimice sînt extraşi.

Claviceps paspali este unul dintre producătorii importanţi de acid lisergic. In anul 1960, Chain a izolat o tulpină a acestei ciuperci capabilă să crească pe instalaţii industriale în profunzime şi să producă alcaloizi asemănători cu cei produşi de Claviceps purpurea.

- Obţinerea de hormoni de creştere (giberelinele)

Giberelinele formează un grup de substanţe cu o structură chimică complexă, conţinînd un nucleu tetracarboxilic, gibanul (fig.78).

Aceste substanţe sînt produse de ciuperca Gibberella fujikuroi. Toate au efecte stimulatorii asupra creşterii plantelor.

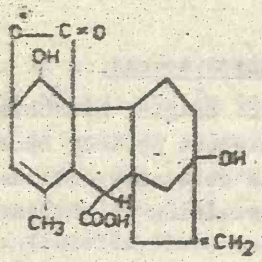


Fig.76. Formula chimică generală a gibberelinelor.

Dintre principalele gibereline mai bine cunoscute şi studiate este acidul giberelinic. Efectul stimulator asupra plantelor a acestuia, se manifestă chiar la concentraţii foarte scăzute. De exemplu, diluarea sa în raport de 1/1 milion stimulează semnificativ creşterea plantelor. Stimularea creşterii plantelor este evidentă în faza de germinare. Totodată s-a constatat că aceste substanţe limitează atacul diferitelor boli, creînd rezistenţă plantelor.

- Obţinerea de toxine

Mul'e bacterii produc substanţe cu acţiune toxică ce au efecte destructive asupra organismelor infectate. Aceste substanţe produse de microorganisme au fost folosite la obţinerea de anatoxine. Anatoxinele au rolul de a neutraliza efectele toxice ale toxinele microbiene, avînd astfel o largă utilizare în tratarea unor forme de alergii la om.

Multe dintre microorganismele producătoare de metaboliţi secundari, dar în mod special cele producătoare de antibiotice sînt sensibile la propriul lor produs în timpul trofofazei, dar devin rezistente în cursul idiofazei. Din aceste considerente este foarte important ca trecerea de la trofofază la idiofază să se facă cît mai rapid. Pe parcursul ideofazei nu trebuie să apară tendinţa de redresare a unui proces prin întoarcerea la trofofază , deoarece conţinutul de antibiotic din mediu va avea efecte distructive însemnate asupra formelor microbisne tinere.

3. Obţinerea de enzime microbiene

Cu excepţia papainei, extrasă din papaia, toate celelalte enzime se pot obţine cu ajutorul microorganismelor. Microorganismele au capacitatea metabolică de a le produce, sau de a fi determinate să le producă, în cantităţile dorite.

Enzimele fiind macromolecule proteice cu activitate catalitică, modul de acţiune a lor va fi dependentă de structura primară, adică de modul de secvenţionalizare a aminoacizilor în moleculă.

Deşi s-a încercat sinteza lor pe cale chimică, s-a constatat că singura cale posibilă şi avantajoasă ar fi cea microbiană.

In prezent pe cale industrială cu ajutorul microorganismelor, în ţările dezvoltate (Anglia, Germania, SUA, Japonia, Suedia, Franţa, etc.) se produc cantităţi mari de proteaze, glucamilaze, alfa-amilaze, glucoz-izomeraze. Hidroliza amidonului, fabricarea sucurilor din fructe, a pîinii, a preparatelor din lapte, a berei, a vinului şi detergenţilor consumă mari cantităţi din astfel de enzime.

Pe lîngă aceste enzime de largă utilizare industrială în prezent sînt produse şi alte enzime cu utilizare mai restrînsă în medicină, industria alimentară, zootehnie sau în alte procese catalitice industriale. Obţinerea acestora se face la scară pilot sau semiindustrială, în funcţie de necesităţi.

Numărul enzimelor obţinute în prezent cu ajutorul microorganismelor este relativ mare. Cele mai importante precum şi domeniile lor de utilizare sînt prezentate în tabelul 9.

Tabelul 9

Enzime microbiene şi domeniile lor de utilizare

Enzime	Producătorul	Domeniul de utilizare
1	2	3
Amilaze (α, β)	Bacillus sp. Aspergillus niger Aspergillus oryzae	Hidroliza amidonului la dextrine, maltoză şi glucoză. Zaharificarea substanţelor amilacee pentru fermentaţia alcoolică. In industria textilă la îndepărtarea apretului de amidon
Proteaze	Bacillus licheniformis Bacillus subtilis Aspergillus sp. Saccharamyces cerevisiae Clostridium sp.	Hidroliza proteinelor de origine animală şi vegetală, prepararea brînzeturilor, fabricarea sosului de soia, prepararea unor codimente pe bază de aminoacizi, tratarea pieilor, activarea digestiei, eli inarea

Tabelul 9 (continuare)

1	2	3
		depozitelor de proteine din băuturile fermentate: sucuri de fructe, bere, vin. Prăgezirea cărnii
Renina (chiagul)	Mucor sp. Endothia parasitica	Închegarea laptelui
Lipaze	Saccharomycopsis lipolytica	Fabricarea untului şi glicozidelor. Activanţi digestivi
Pectinaze	Aspergillus niger	Clarificarea sucurilor de fructe şi a vinului
Hemicelulaze Celulaze	Trichoderma reesii Aspergillus niger	Hidroliza hemicelulozei din cereale şi legume. Hidroliza celulozei la glucoză
Invertaza	Aspergillus oryzae Saccharomyces cerevisiae	Producerea zahărului invertit (amestec de glucoză şi fructoză) pornind de la zaharoză
Glucoz-izomeraza	Bacillus spp. Bacillus coagulans	Izomerizarea glucozei în fructoză (fabricarea siropurilor de fructoză pornind de la amidon de porumb)
Catalaza	Bacillus subtilis Corynebacterium sp.	Înlăturarea oxigenului din alimente. Înălbirea grăsimilor. Conservarea laptelui
Uricaza	Saccharomyces sp. Streptomyce sp.	Descompunerea acidului uzic
Aspartaza	Bacillus sp.	Producerea de acid aspartic pornind de la acid fumaric. Producerea de acid malic pornind de la acid fumaric
Penicilinaze	Bacillus subtilis	Degradarea penicilinei

Producerea de enzime cu ajutorul microorganismelor se realizează cu succes deoarece concentraţiile acestora pot fi sporite în mod considerabil prin modificarea factorilor de mediu sau prin modificarea genomului celulei producătoare.

In afară de aceasta, microorganismele spre deosebire de plante şi animale cresc foarte repede, au o rată de multiplicare surprinzător de mare producînd în intervale de timp relativ mici cantităţi mari de enzimă. Apoi, metabolismul lor poate fi orientat spre producerea unei singure enzime care se va putea extrage uşor din lichidul de cultură, fără a implica cheltuieli suplimentare. Toate acestea au făcut să se renunţe la obţinerea unor enzime din produsele animale şi vegetale. Astfel, multe firme producătoare de bere au renunţat la amilazele obţinute prin germinarea grîului sau orzului. Apoi, multe amilaze microbiene sînt utilizate din ce în ce mai extins în industria de panificaţie şi industria textilă. Pe de altă parte, proteazele au înlocuit şi ele pe cele obţinute din produsele animale şi vegetale, ele fiind folosite din ce în ce mai mult la frăgezirea cărnii, în tăbăcirea pieilor şi fabricarea detergenţilor. Renina obţinută cu diferite specii de ciuperci a înlocuit cheagul obţinut de la animale, ea fiind larg utilizată în prezent la fabricarea brînzeturilor.

Transformarea amidonului de porumb în glucoză şi fructoză se realizează tot cu enzime microbiene, pe care cale se obţine acel sirop de fructoză foarte apreciat pentru calităţile sale nutritive. Inlocuirea zaharozei din băuturile nealcoolizate şi din alte produse alimentare a mărit şi mai mult interesul pentru producerea de enzime microbiene la scară industrială.

Cel puţin unele dintre enzimele microbiene, în ultimul timp au început să joace un rol din ce în ce mai important în diagnosticul medical. Astfel, colesteroloxidaza serveşte la dozarea colesterolului în serul sanguin, iar uricaza este din ce în ce mai mult folosită la dozarea acidului uric în ţesutul uman.

Enzimele de origine microbiană ar putea să joace un rol important şi în industria maselor plastice. Obţinerea lor în prezent pe cale chimică se face prin procese de polimerizare a unor lanţuri carbonice neramificate ce conţin cel puţin o dublă legătură, dar s-ar putea realiza cu succes şi mult mai eficient cu ajutorul unor sisteme enzimatice ca factori catalizatori a acestor reacţii. In SUA, Neidelman, de la Cetus Corporation a reuşit să pună la punct fabricarea oxidului de propilenă pe cale enzimatică. Procedeul are la bază trei enzime microbiene: piranoze-2-oxidaza ex-

trasă de la ciuperca Oudemansiella mucida, care catalizează formarea apei oxigenate (H_2O_2) pornind de la glucoză, haloperoxidaza produsă de ciuperca Caldariomyces, care catalizează reacţia dintre apa oxigenată cu un alcen şi un ion halogen (florură, clorură sau bromură) din care rezultă un alcen legat de o grupare hidroxil (OH) şi un halogen şi, o epoxidază produsă de Flavobacterium, care detaşează hidrogenul din gruparea hidroxil şi ionul halogen al oxidului de alcen.

Spre deosebire de sintezele chimice, sintezele enzimatice ale oxidului de propilenă prezintă o serie de avantaje care nu pot şi nu trebuie subapreciate. De exemplu:

- ionul de halogen poate fi furnizat de o sare banală: clorura de sodiu;
- unii subprodusi ai acestor biosinteze, cum ar fi fructoza şi acidul gluconic devin disponibili pentru alte ramuri industriale. De exemplu, fructoza se poate utiliza în industria alimentară ca îndulcitor, iar acidul gluconic se poate folosi la fabricarea unor detergenţi de spălat vasele;
- înlătură poluarea, deoarece halogenul este recirculat.

In ultimii ani se constată o tendinţă tot mai mare de utilizare a enzimelor şi celulelor microbiene în formă imobilizată pe diferite suporturi. Prin această cale se creşte foarte mult randamentul de folosire a unei enzime, dar nu numai atît. Imobilizarea creşte stabilitatea enzimei, stabilitatea pH de reacţie, se obţin produşi de mare puritate, enzima se poate recupera şi reutiliza, se reduc procesele de inhibiţie enzimatică, enzima se produce, în cazul celulelor imobilizate, în mod continuu, există posibilitatea cuplării procesului enzimatic cu procesul de catalizã, etc.

Se cunosc în prezent numeroase metode de imobilizare a enzimelor şi celulelor microbiene. Ele sînt clasificate în felul următor:

1) Metode de fixare. Fixarea enzimei sau celulelor pe suportul de imobilizare se poate face prin:
   a) legarea covalentă;
   b) absorbţie.

2) Metode de entrapare. Entraparea enzimei sau celulelor se poate face:
   a) în interiorul unui polimer;
   b) prin microîncapsulare;

c) prin legarea chimică cu legături disponibile;
d) prin entrapare în membrane semipermeabile.

Indiferent de metoda de imobilizare utilizată, important este ca enzima să nu-şi modifice activitatea sau funcţiile, iar microorganismul să poată prelua cu uşurinţă substanţele din mediu de reacţie, astfel încît biosinteza enzimei să se facă normal.

4. Obţinerea de polizaharide

Microorganismele pot produce cantităţi apreciabile de polizaharide pe care le pot depune la suprafaţa celulei formînd capsula. Polizaharidele capsulare întîlnite la unele categorii de bacterii sînt substanţe cu greutate moleculară cuprinsă între 50.000-100.000 daltoni. Aceste substanţe pot fi dextrani sau xantani.

Dextranii sînt produşi de unele specii de Leuconostoc, cum ar fi Leuconostoc mesenteroides şi de unele bacterii lactice. Producerea lor are loc atunci cînd mediul de cultură conţine un exces de substrat zaharat. Toate microorganismele producătoare de dextrani au capacitatea metabolică de a produce dextranaze care catalizează reacţia de hidroliză a zaharozei în glucoză şi fructoză: fructoza este folosită de bacterie sau microorganismul producător pentru creşterea şi dezvoltarea sa, pe cînd glucoza este polimerizată în dextran.

Dextranii au căpătat o largă utilizare în medicină care îi utilizează ca substituienţi ai plasmei sanguine, deoarece prin legarea lanţurilor polimerului între ele rezultă corpusculi care constituie filtre moleculare foarte eficiente în cadrul sistemului vascular.

Xantanii sînt substanţe asemănătoare gumei. Ei sînt produşi de Xanthomonas campestris, atunci cînd este cultivat pe un mediu cu glucoză şi în condiţii de aerobioză.

Xantanii sînt polimeri ramificaţi, formaţi din molecule de glucoză, manoză, acid glucuronic care poartă uneori grupări acetil (CH_3CO) şi piruvat (CH_3COCO). Xantanii şi-au căpătat şi ei o largă utilizare în domenii foarte diferite: industria alimentară în care caz se utilizează ca adjuvanţi ai unor alimente pentru a le mări vîscozitatea, sau ca stabilizatori, industria textilă, la vopsirea şi imprimarea fibrelor, industria farmaceutică, la fabricarea produselor farmaceutice, industria extractivă, la recuperarea petrolului. In SUA utilizarea lor în extracţia petrolului a devenit deja o tradiţie, aceasta deoarece xantanii adăugaţi la nămolul de extracţie creşte randamentul cu peste 20 %.

5. Folosirea microorganismelor în procesele de bioconversie

Bioconversiile reprezintă totalitatea proceselor prin care un microorganism convertant transformă un metabolit într-un compus cu o structură asemănătoare, dar cu proprietăţi diferite faţă de produsul de origine. Deci, bioconversia reprezintă totalitatea reacţiilor chimice prin care microorganismul convertant transformă enzimatic un produs chimic în alt produs.

Bioconversiile sînt specifice deoarece se referă la o reacţie determinată şi un compus cu o structură definită.

Se cunosc diferite tipuri de conversii microbiene, de exemplu, transformarea izopropanului în acetonă, a glicerolului în dihidroxiacetonă, a glucozei în acid gluconic, a alcoolului etilic în acid acetic, etc., dar exemplul cel mai tipic este conversia microbiană a steroizilor.

Sinteza chimică a steroizilor se realizează în 37 etape, în timp ce pe cale microbiană se poate realiza în numai 11 etape. Ea constă în introducerea unui atom de oxigen în poziţia a 11 α a nucleului sterolic printr-un proces de hidroxilare (fig.79), cu ajutorul bacteriei Rhizopus arrhizus.

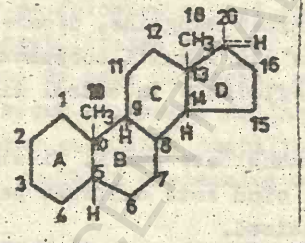


Fig.79. Structura chimică a nucleului sterolic.

Procesele de bioconversie microbiană, spre deosebire de procesele chimice care se realizează la temperaturi şi presiuni extreme, au loc la 37°C şi la presiunea atmosferică.

In ultimul timp s-au pus la punct şi alte procedee de conversie microbiană a steroizilor. Astfel, cu ajutorul drojdiilor, androstendiona este convertită la testosteron, iar cu ajutorul actinomicetului Nocardia restrictus se realizează sinteza estronului. Bacteria Corynebacterium simplex realizează dehidrogenarea cortizonului şi dehidrocortizonului convertindu-i la predinson şi respectiv, la predinsolon.

Mai mult, unii mutanţi microbieni pot să realizeze degradarea incompletă a sterolului, după care produc molecule utile sintezei altor steroizi.

Unele procese de bioconversie a steroizilor necesită utilizarea de culturi mixte sau folosirea în succesiune a unor specii microbiene. In felul acesta unele specii realizează o anumită etapă sau etape ale bioconversiei, iar celelalte desăvîrşesc bioconversia.

Folosirea celulelor imobilizate a permis creşterea randamentului de bioconversie şi stabilitatea procesului. In viitor se apreciază că pe această cale va fi posibil să se obţină şi alte substanţe de bioconversie.

6. Folosirea microorganismelor în extracţia substanţelor minerale şi a ţiteiului

Ştiinţa care se ocupă cu studiul acestor microorganisme, precum şi cu studiul proceselor pe care le realizează ele este cunoscută sub numele de biogeotehnologie.

In raport cu conceptele acestei ştiinţe, microorganismele şi metaboliţii lor pot fi utilizaţi în diferite domenii ale industriei miniere şi în extracţia petrolului.

6.1. Folosirea microorganismelor în extracţia metalelor şi cărbunelui

Intr-un viitor nu prea îndepărtat se va ridica problema obţinerii metalelor din minereuri sărace şi deşeuri industriale. Tehnologiile tradiţionale şi cele actuale nu pot să asigure valorificarea eficientă din punct de vedere economic a acestor minereuri. Rezolvarea într-un mod avantajos şi nepoluant se poate, însă realiza cu ajutorul microorganismelor.

Microorganismele heterotrofe sau metaboliţii lor pot fi folosiţi în extracţia elementelor chimice din silicaţi şi carbonaţi, precum şi pentru extracţia aurului. Biomasa şi lipidele microbiene pot fi folosite pentru realizarea proceselor de flotare a minereurilor, iar cu ajutorul biomasei şi al polizaharidelor microbiene se poate realiza extracţia selectivă din soluţiile multicomponente.

Procesele de extracţie a minereurilor cu ajutorul microorganismelor au la bază o serie de reacţii chimice de oxidare (oxidarea sulfurilor metalice, a sulfului, fierului, etc.) precum şi unele reacţii de descompunere a silicaţilor.

In procesele de extracţie a diferitelor metale un rol important îl joacă următoarele specii de microorganisme: Thiobacillus ferrooxidans, Leptospirillum ferrooxidans, Thiobacillus thiooxidans şi Thiobacillus organoparus. La acestea s-ar mai putea adăuga o serie de bacterii termofile neidentificate în prezent.

Mecanismul oxidării sulfurilor de către microorganisme nu este încă cunoscut în întregime. Se apreciază că procesele de oxidare microbiană sînt asemănătoare cu cele electrochimice şi ar consta în aderarea bacteriilor la componenţii minereului acţionînd asupra potenţialului lor de electrod.

Prin mecanismele de oxidare a sulfurilor devine posibilă trecerea în soluţie şi extracţia majorităţii elementelor rare, precum şi a metalelor neferoase din minereuri sau concentratele multicomponente.

Adeseori metodele microbiologice de extracţie se pot combina cu cele chimice sau alte metode clasice ale metalurgiei. De exemplu, la extracţia uraniului au loc următoarele transformări:

$$UO_2 + 2\ Fe^{3+} \xrightarrow{\text{chimic}} UO_2^{2+} + Fe^{2+}$$

Thiobacillus ferrooxidans oxidează Fe^{2+} pînă la Fe^{3+} care face ca uraniul să treacă din forma insolubilă (U^{4+}) în forma solubilă (U^{6+}) care este extractibilă.

Microorganismele sînt din ce în ce mai larg utilizate şi în extracţia unor metale rare sau a unor metale toxice. De exemplu, Aspergillus oryzae se foloseşte în extracţia aurului din soluţiile care nu conţin cianuri, iar unele microorganisme din grupa bacteriilor şi ciupercilor pot fi folosite la extracţia metalelor toxice (plumb, mercur, arseniu) din apele uzate sau unele minereuri.

Desulfurarea cărbunelui este un alt domeniu în care microorganismele ar putea să joace un rol foarte important. Este cunoscut că, calitatea cărbunelui este depreciată în cazul în care conţine sulf sub formă de pirită. Prin arderea unui astfel de cărbune se produce o intensă poluare atmosferică care face ca ploile să fie acide. Prelucrarea preliminară a cărbunelui cu bacteria Thiobacillus ferrooxidans conduce la oxidarea unei părţi semnificative a piritelor şi diminuarea efectelor poluante. În afară de aceasta, bacteriile au proprietatea de a produce lipide care aderă la particolele de pirită făcîndu-le hidrofobe şi determinîndule să sedimenteze odată cu şisturile.

In multe mine de cărbune se acumulează metan ce creşte foarte mult pericolul de extracţie şi imposibilitatea exploatării sale. Inlăturarea sa se face în general prin metode fizice pe care cale se înlătură aproximativ 20 % din conţinutul său, dar prin aceasta nu se înlătură pericolul de explozie. In ultimii 10 ani s-a constatat că microorganismele ar putea juca şi în acest domeniu un rol foarte important. Este cunoscut că bacteriile metanogene oxidează metanul transformîndu-l în bioxid de carbon şi apă. Aceasta a determinat pe mulţi specialişti în domeniu să folosească microorganismele în oxidarea metanului din minele de cărbune, reducîndu-se astfel în totalitate pericolul exploziei. In acest scop microorganismele metanooxidante s-ar putea obţine fie în instalaţii biotehnologice după care se introduc sub presiune în şisturile carbonifere sau prin cultivarea directă a lor în şisturile carbonifere.

6.2. Folosirea microorganismelor la extracţia ţiţeiului

Prin metodele tradiţionale se poate extrage aproximativ 50% din petrolul din zăcămînt, restul de 50 % rămînînd în capilarele rocilor. Pentru a se realiza o extracţie mai eficientă s-a recurs la metodele microbiologice, prin care ţiţeiul este pus în libertate de rocă devenind extractibil.

Se folosesc în prezent mai multe procedee de intensificare a extracţiei cu ajutorul microorganismelor:

1) Procedee de stimulare a microflorei naturale a zăcămîntului. Pe această cale se urmăreşte stimularea microflorei prin introducerea în zăcămînt a unor substanţe nutritive ce fac ca aceasta să se dezvolte şi să facă posibilă eliberarea ţiţeiului din rocă.

2) Procedee de injectare a microorganismelor specializate în zăcămînt. Prin intermediul acestora şi a metaboliţilor lor ţiţeiul din rocă este eliberat şi devine extractibil.

3) Procedee de obţinerea pe cale biotehnologică a unor produse microbiene şi injectarea lor în zăcămînt. In felul acesta se micşorează vîscozitatea ţiţeiului făcîndu-l uşor extractibil.

La extracţia petrolului se pot folosi microorganisme aparţinînd genurilor: Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus, Arthrobacter, Clostridium, Sarcina, Methanococcus, Serraţia, Disulfovibrio, Thiobacillus, Xanthomonas, etc.

In industria petrolului microorganismele se pot folosi nu numai la extracţie, ci şi la prelucrare. Este cunoscut că petrolul conţine compuşi cu sulf. Cu cît cantitatea acestora este mai mare, cu atît calitatea ţiţeiului este mai scăzută. Pentru îndepărtarea sulfului din ţiţei se pot folosi microorganismele ce aparţin genului Thiobacillus.

In prezent se fac studii pentru obţinerea unor bacterii cu capacitate mărită de degradare a compuşilor cu sulf din ţiţei.

Metodele microbiologice folosite în diferitele domenii ale industriei extractive, spre deosebire de cele chimice sînt mult mai avantajoase datorită eficienţei lor şi gradului de poluare redus. Prin utilizarea metodelor microbiologice poluarea se poate îndepărta total sau se poate reduce la minimul posibil.

7. Folosirea microorganismelor în rezolvarea unor probleme medicale

O serie de preparate bacteriene şi virale se folosesc în prezent în tratarea diferitelor boli infecţioase la om şi animale. Aceste preparate sînt cunoscute sub numele de vaccinuri. Cele mai multe se obţin în prezent pe căi biotehnologice.

Vaccinurile sînt preparate imunoprofilactice care constau din forme modificate ereditar ale unor agenţi ai bolilor infecţioase cum ar fi: bacteriile sau virusii. Tulpinile microbiene folosite ca vaccinuri au o virulenţă remanentă şi nu sînt capabile să producă boli specifice.

Tulpinile de microorganisme producătoare de vaccinuri diferă calitativ de tulpina iniţială, atît prin capacitatea de a nu mai produce boala cît şi prin capacitatea de a induce mutaţii imunologice.

Tulpinile microbiene utilizate în obţinerea de vaccinuri sînt cunoscute sub denumirea de tulpini atenuate. Alegerea unei tulpini atenuate este prima etapă în crearea unui vaccin viu. Există mai multe căi de obţinere a unei tulpini atenuate:

1) prin selecţia de mutanţi apăruţi spontan. Pe această cale s-a reuşit să se obţină vaccinuri pentru: ciumă, bruceloză şi poliomelită;

2) prin obţinerea pe cale artificială de tulpini atenuate. Acestea se obţin prin acţiunea asupra germenului patogen cu metode microbiologice sau genetice de modificare şi anume:

- prin cultivarea agentului infecţios o perioadă îndelungată de timp pe medii nutritive artificiale, în condiţii

nefavorabile. Prin aplicarea acestei metode s-au obţinut vaccinuri pentru combaterea antraxului, vaccinul BCG şi altele;

- prin transferul agentului infecţios pe alte specii animale receptoare sau nereceptoare. Astfel au fost obţinute vaccinurile pentru variolă, vaccinul antirabic şi altele;

- prin acţiunea directă cu un agent mutagen asupra materialului genetic al bacteriei şi virusului din care urmează să se obţină vaccinul;

3) prin obţinerea de recombinenţi genetici cu virulenţă scăzută. Această metodă a fost aplicată în obţinerea de vaccinuri gripale.

In general, după obţinerea unui vaccin, indiferent de metodă, apare necesitatea menţinerii caracteristicilor sale pe cît posibil în stare nemodificată, astfel încît să nu aibă loc trecerea din forma atenuată în forma virulentă.

Procesele tehnologice de obţinere a unui vaccin se realizează după următoarea schemă generală (fig.80).

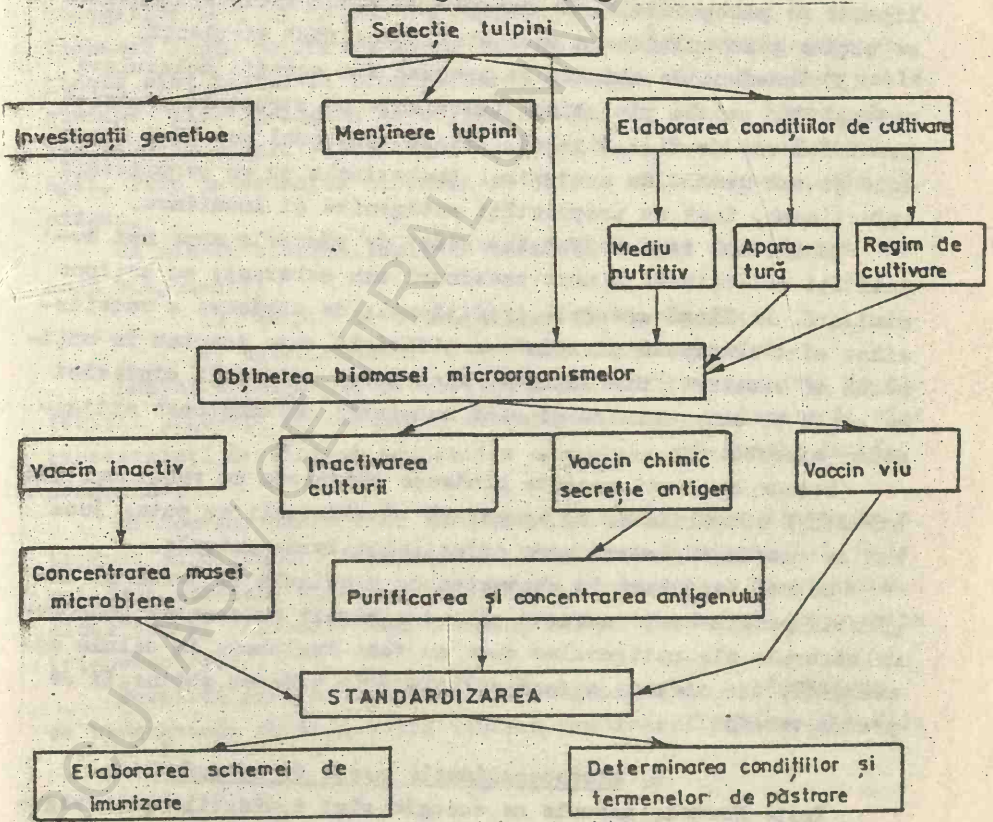


Fig. 80. Schema proceselor tehnologice de obţinere a unui vaccin (după Viesturs, et. al 1991)

După cum reiese din schemă precum şi după metodologiile lor de obţinere, vaccinurile pot fi:

1) Vaccinuri inactivate.
2) Vaccinuri vii.
3) Vaccinuri chimice.

1) Vaccinurile inactivate nu sînt altceva decît celule microbiene (bacterii sau rickettsii) inactivate prin acţiunea unor factori fizici (temperatură sau raze UV) sau chimici (aldehidă formică, acetonă, alcool, metale grele, etc.). In urma acţiunii acestor factori trebuie să se evite apariţia unor modificări corpusculare care nu ar duce la apariţia unor vaccinuri vii. Pentru obţinerea acestor vaccinuri se folosesc microorganisme puternic patogene cu o structură antigenică specifică.

2) Vaccinurile vii sînt acele care se obţin direct din biomasa bacteriană fără intervenţia unor procese de inactivare. Acestea se obţin în general din microorganisme slab patogene sau lipsite de patogenitate. De exemplu vaccinul antistafilococic se obţine prin cultivarea unui stafilococ fără virulenţă.

3) Vaccinurile chimice se prepară din agenţii moleculari extraşi din celula microbiană (substanţe cu structură proteică specifică cum ar fi toxinele). Aceste vaccinuri mai sînt cunoscute şi sub numele de anatoxine. Anatoxinele nu au proprietăţi infecţioase, însă au proprietăţi antigenice şi imunitare.

In ultimul timp se fac încercări de găsire a unor noi modalităţi de obţinere a unor vaccinuri sau substanţe cu acţiune similară. Pe lîngă metodele tradiţionale de obţinere a vaccinurilor sînt concepute şi metode artificiale care constau în obţinerea de vaccinuri din antigeni sintetici. Antigenii sintetici se obţin pe cale chimică şi sînt substanţe asemănătoare antigenelor microbiene.

Metode ceva mai recente urmăresc obţinerea de vaccinuri din structuri subcelulare. Se apreciază că ribozomii ar putea juca rol de vaccinuri în tratarea diferitelor forme gripale.

Un rol important în obţinerea de vaccinuri îl joacă şi ingineria genetică. Pe această cale s-a reuşit extragerea unor gene naturale ale antigenelor care au fost înglobate în celula microbiană, iar aceasta a fost cultivată în vederea obţinerii de produs vaccinal.

8. Microorganismele surse de energie

Toate formele actuale de energie sînt epuizabile şi nerege-

nerabile. Intr-un viitor nu prea îndepărtat sursele energetice vor deveni insuficiente, de aceea se impune cu necesitate găsirea unor forme energetice mai mult sau mai puţin convenţionale care să asigure existenţa planetei. O cale modestă, dar de loc de neglijat o reprezintă şi microorganismele. Este cunoscut deja că, cu ajutorul lor se poate obţine gaz metan, biogaz, alcooli combustibili şi hidrogen. Dintre toate acestea deosebit de rentabil ar fi obţinerea de hidrogen, biogaz şi etanol, pe această cale rezolvîndu-se şi unele probleme de protecţie a mediului.

8.1. Obţinerea de hidrogen cu ajutorul microorganismelor

In prezent este din ce în ce mai discutată problema utilizării hidrogenului ca combustibil, datorită efectelor sale poluante extrem de reduse.

Hidrogenul se poate obţine pe cale chimică, dar cu costuri energetice mari şi în mod neeficient. In ultimul timp se investighează amplu obţinerea sa pe cale microbiană. Rezultatele obţinute sînt destul de promiţătoare. S-au pus deja la punct unele sisteme biotehnologice de obţinere a sa. Un sistem biotehnologic relativ simplu şi eficient este cel care realizează fotoliza apei. Prin intermediul acestuia se obţine atît hidrogen, cît şi oxigen.

Un sistem biotehnologic de fotoliză a apei este format din două componente:

1) lanţul de transportori de electroni;
2) catalizatorii de formare a hidrogenului.

Lanţul transportor de electroni poate fi reprezentat de diferiţii pigmenţi ai celulelor microbiene, iar catalizatorii sînt reprezentaţi de sisteme enzimatice cunoscute sub numele de hidrogenaze.

Microorganismele deşi în număr limitat au capacitatea de a produce catalizatori implicaţi în biosinteza hidrogenului. Cele mai bine studiate sînt reprezentanţi ai genurilor: Clostridium, Alcaligenes, Halobacterium. Rhodospirillum (bacterii) şi Anabena (cianobacterie).

Fotoliza apei cu ajutorul microorganismelor producătoare de hidrogenaze se desfăşoară conform următoarei scheme (fig.81):

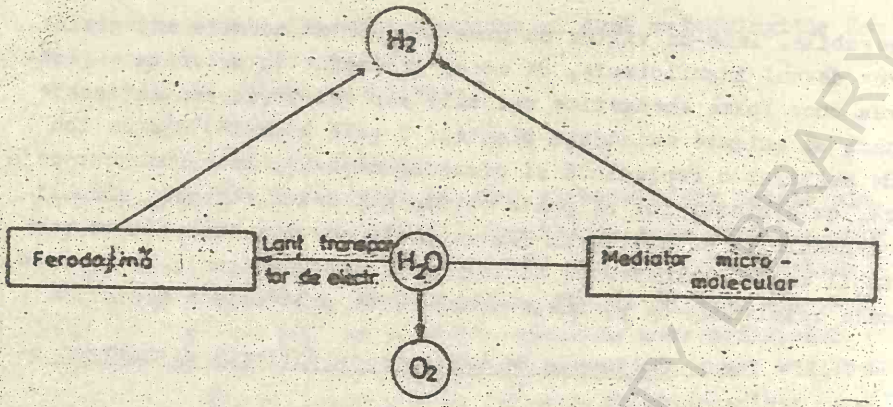


Fig.81. Schema de fotoliză a apei cu ajutorul hidrogenazelor (după Viesturs, 1991).

Hidrogenazele pot fi folosite atît sub formă dizolvată cît şi sub formă imobilizată. Cu rezultate relativ bune se pot folosi şi celulele imobilizate a microorganismelor producătoare de hidrogenaze.

In cazul în care se folosesc celulele de cianobacterii, reacţiile decurg în felul următor:

$$H_2O \xrightarrow[\text{la lumină}]{\text{celule}} \text{Metaboliţi energo-capacitivi}$$

$$O_2 \xrightarrow[\text{la întuneric}]{} H_2$$

In cazul în care se folosesc celulele imobilizate atunci reacţia decurge în felul următor:

$$H_2O + 2NAD^+ \xrightarrow{\text{Anabena nidulans}} 2\ NADH + 1/2\ O_2$$

$$2\ NADH \xrightarrow{\text{Rhodospirillum rubrum}} H_2 + 2\ NAD^+$$

Interesul pentru această formă de energie este indiscutabil din mai multe considerente: substratul de fotoliză, apa, este din abundenţă, sursa de energie, radiaţiile solare, sînt inepuizabile, hidrogenul poate fi depozitat, are o putere calorică foarte ridicată (29 Kcal/g faţă de 3,5 Kcal/g în cazul glucozei), procesele se desfăşoară la temperatură normală, din proces nu rezultă

produşi toxici.Cu toate, avantajele pe care le prezintă această sursă de energie,totuşi obţinerea sa la scară se face în prezent deficitar, cel puţin din punct de vedere a randamentelor de producţie care nu satisfac. În prezent se urmăreşte ameliorarea acestora prin realizarea unor tulpini microbiene înalt productive.

Ameliorarea randamentelor de producere a hidrogenului constă în obţinerea de hidrogenaze mai puţin sensibile la oxigen, şi mai stabile din punct de vedere catalitic.

8.2. Producerea de biogaz

Procesul de transformare a unor deşeuri sau materiale cu ajutorul microorganismelor în gaze combustibile poartă numele de biometanogeneză.

Producerea de biogaz cu ajutorul microorganismelor se realizează în trei faze:

1) Faza de solubilizare şi hidroliză a componenţilor organici.

2) Faza de acidogeneză.

3) Faza de metanogeneză.

Procesul este continuu , deoarece transformările energetice nu interesează în cele din urmă decît jumătate din materia organică, microflora metanogenă neavînd posibilităţi mai mari de transformare. Trei grupe de bacterii intervin în acest proces de solubilizare şi transformare: primele transformă substanţele organice complexe în acid butiric, propionic şi lactic; al doilea grup sînt bacterii acetogene care transformă acizii organici în acid acetic, hidrogen şi bioxid de carbon şi al treilea grup sînt bacterii metanogene, care reduc pe de o parte bioxidul de carbon la metan, iar pe de altă parte, consumă hidrogenul care în exces ar inhiba activitatea bacteriilor acetogene.

Din punct de vedere biochimic fermentaţia metanică este o respiraţie anaerobă în care electronii proveniţi de la substratele organice ajung în cele din urmă la CO_2 care este apoi redus la metan.

În procesul de metanogeneză intervin mai multe specii microbiene ce au un rol în degradarea nucleilor aromatici pînă la acetat care este substratul de bază al bacteriilor metanogene. În categoria bacteriilor metanogene intră: Methanobacterium formicicum şi Methanospirillum humgate. Prin acţiunea acestor bacte-

rii nucleul benzenic este mai întîi redus, apoi clivat în acizi alifatici, aceştia sînt mai departe transformaţi în substrate de biosinteză a metanului. Procesele de biosinteză propriu-zise sînt realizate de către metanbacterii.

Metanbacteriile în condiţii naturale sînt strîns asociate cu bacteriile producătoare de hidrogen, prin aceste asocieri se realizează un echilibru metabolic specific. Acest echilibru se realizează în felul următor: grupul de bacterii metanoformatoare (metanbacteriile) folosesc hidrogenul produs de bacteriile producătoare împiedicîndu-se în felul acesta eventualele sale efecte toxice, iar acestea dehidrogenează un nou substrat eliberînd noi molecule de hidrogen, care asigură continuitatea procesului.

9. Obţinerea de îngrăşăminte microbiene şi de produse de combatere a dăunătorilor

Odată cu scăderea resurselor chimice şi cu majorarea preţurilor la îngrăşămintele azotate, o importanţă tot mai mare a început să se acorde modului natural, biologic de îngrăşăminte a solurilor.

Din punct de vedere microbiologic aceasta se poate realiza cu ajutorul bacteriilor fixatoare de azot. Aceste bacterii realizează o asociaţie cu planta gazdă în cadrul căreia se stabilesc relaţii de „întrajutorare" reciprocă. Planta gazdă pe care se dezvoltă bacteria, ia din sol diferite substanţe nutritive, iar prin sinteza de metaboliţi va pune la dispoziţia acesteia sursele necesare pentru creştere şi dezvoltare. Bacteria la rîndul ei asimilează azotul atmosferic şi îl pune la dispoziţia plantei gazde care îl foloseşte în sinteze celulare.

Cea mai interesantă asociaţie dintre o plantă şi un microorganism este cea dintre plantele leguminoase şi bacteriile genului Rhizobium. Tulpini active ale unor astfel de bacterii se găsesc în sol în cantităţi neglijabile sau pot chiar să lipsească. De aceea ele trebuie obţinute şi cultivate în instalaţii speciale pe care apoi se obţine o cultură densă ce poate fi folosită în special în tratarea seminţelor înainte de semănat. Acest proces de creştere şi cultivare a bacteriilor care fixează azotul duce în final la obţinerea unui produs biotehnologic cunoscut sub numele de nitragin.

Nitraginul nu este altceva decît celule de Rhizobium care au fost fixate pe turbă la care se adaugă unele substanţe nutritive şi se aduce umiditatea la 40-55 %. Sub această formă se

livrează şi se introduce în sol odată cu seminţele plantei de cultură. Sub această formă însă nitraginul nu se poate folosi cu rezultate suficient de bune deoarece duce la înfundarea semănătorilor în timpul semănatului.

Recent s-a constatat că conservarea sa sub formă de granule este mult mai eficientă, deoarece nu mai are loc înfundarea semănătorilor şi se evită eventualele contaminări cu alte microorganisme. Această tehnologie se foloseşte cu succes în Anglia de către firma Allen and Handberis.

In ultimul timp pe lîngă îngrăşămintele cu bacterii s-a reuşit să se obţină şi unele îngrăşăminte cu cianobacterii şi ciuperci. Ingrăşămintele obţinute cu cianobacterii prezintă o serie de avantaje de luat în considerare. Ele pe lîngă faptul că fixează azotul atmosferic mai dizolvă şi fosfaţii din sol, formează stimulatori de creştere pentru plante şi îmbunătăţesc structura solului. Ingrăşămintele obţinute cu ciuperci se pot folosi ca surse de fosfor pentru plante cu rezultate remarcabile.

Ingrăşămintele microbiene au intrat deja în practica agricolă mondială din mai multe considerente: nu sînt poluante, au efecte nutriţionale net superioare celor chimice, nu modifică structura solului şi nici echilibrele biologice dintre principalele organisme din sol.

Microorganismele se pot utiliza cu succes şi în obţinerea de pesticide, erbicide, şi insecticide. In obţinerea lor se pot folosi bacteriile ciupercile şi chiar viruşii. Aceste preparate pe lîngă faptul că nu sînt poluante pot fi folosite în combinaţie cu îngrăşămintele microbiene fără a perturba echilibrul solului. Ele sînt mijloace de combatere a dăunătorilor animali sau vegetali, fără a prezenta efecte dăunătoare asupra omului sau a altor vieţuitoare, deoarece acţiunea lor este direcţionată strict asupra unor specii de dăunători animali sau vegetali. Toate se descompun în sol fără a-l polua.

In lupta cu dăunătorii plantelor se folosesc preparatele pe bază de bacterii, ciuperci şi viruşi. Aceste preparate au rolul de a imobiliza sau chiar distruge dăunătorul.

Un preparat bacterian binecunoscut, folosit în combaterea dăunătorilor este turingul, produs de Bacillus thuringiensis. Produsul se obţine prin cultivarea bacteriei în bioreactoare în vederea producerii unei toxine cu efect asupra multor dăunători ai plantelor. Toxina se extrage şi se foloseşte în mod diferit în combaterea biologică.

Ciupercile pot fi şi ele folosite în combaterea dăunătorilor. Cu ajutorul lor combaterea dăunătorilor se poate face în două moduri:

- prin utilizarea de culturi vii;
- prin folosirea produselor lor de metabolism (toxine, antibiotice, enzime).

Se apreciază că folosirea metaboliţilor ar fi mai practică deoarece culturile de ciuperci în stare vie se păstrează destul de anevoios, dar şi utilizarea metaboliţilor ridică unele semne de întrebare, în special în ceea ce priveşte toxicitatea lor faţă de om şi animale.

10. Utilizarea microorganismelor în producerea de proteine (SCP)

Cultivarea microorganismelor în vederea obţinerii la scară mare a proteinelor a apărut ca o soluţie în rezolvarea penuriei de alimente ce domina Germania în perioada celui de al doilea război mondial. La Berlin Delbrück şi colaboratorii săi au pus atunci la punct primul procedeu de cultivare a microorganismelor în vederea obţinerii de proteine (SCP). Se utiliza levura Saccharomyces cerevisiae, a cărei produs de cultivare a fost recomandat ca supliment alimentar la pregătirea supelor şi salamurilor.

Interesul pentru proteinele microbiene a fost amplificat cînd s-a descoperit că reziduurile petroliere pot fi folosite în cultivarea unor microorganisme. Interesul însă n-a fost împărtăşit de marile companii petroliere, care vedeau prin aceasta o diminuare a resurselor pentru industria petrochimică. Cu toate acestea cîţiva ani mai tîrziu (1975 - 1977) se constată şi la acestea o creştere a interesului datorită eficienţei unor procedee şi efectelor pozitive a proteinei obţinute pe astfel de substrate, în special în furajarea animalelor de carne. Se presupunea, la acel moment, că aceasta ar fi o nouă cale de valorificare a produselor petroliere sau a unor deşeuri de prelucrare a lor. Se aprecia, totodată, că proteinele microbiene vor avea un aport important în reducerea deficitului mondial de proteine, care într-un viitor nu prea îndepărtat va pune amprenta asupra multor ţări ale lumii.

Utilizarea microorganismelor în combaterea acestui deficit de proteine ar fi justificat din mai multe puncte de vedere:

1) Microorganismele au un ritm de creştere ridicat. Timpul unei generaţii la bacterii este de 10 - 120 min., la levuri şi ciuperci de 2 - 6 ore, pe cînd la păsări este de 2 - 4 săptămîni, porcine 2 - 6 săptămîni, iar la bovine de 4 - 8 săptămîni.

2) Randamentul zilnic de producere a proteinei la microorganisme este net superior celorlalte organisme animale (Tabelul 10).

Tabelul 10

Randamentul zilnic de producere a proteinei la diferite grupe de organisme

Oragnismul (1.000 kg)	Proteină sintetizată (kg/zi)	Randament zilnic (%)
Bacterii	10^{11}	10^{10}
Levuri	10^{5}	10^{4}
Soia	10	1,0
Bovine	1	0,1

3) Conţinutul în proteine brute a microorganismelor este net superior oricărui organism animal sau vegetal. De exemplu, conţinutul în proteine brute la unele bacterii poate să ajungă la 80 - 82 %, la levuri el se ridică la 40 - 60 %, pe cînd la bovine sau porcine el nu depăşeşte 60 %.

4) Biotehnologiile de obţinere a proteinelor microbiene nu depind de condiţiile climatice, calitatea solului şi nu necesită consumuri mari de materii prime.

5) Cele mai multe biotehnologii au ca substrat biosintetic de bază substanţe ieftine sau chiar deşeuri industriale (deşeuri celulozice, leşii sulfidice, zer, melasă, ape metanolice , etc.)

6) Proteinele microbiene au o valoare nutritivă ridicată, apropiindu-se de cea a proteinei animale, iar în ceea ce priveşte continutul în aminoacizi esenţiali o depăşeşte pe aceasta. Este cunoscut că, carnea de vită este deficitară în cistină şi metionină, ce la multe dintre proteinele microbiene aceşti aminoacizi se găsesc în cantităţi foarte mari, depăşind de 10-20 ori pe cei existenţi în carnea de vită.

10.1. Proteine microbiene obținute din hidrocarburi

La sfîrșitul anilor '50 ai secolului nostru British Petroleum (BP) a manifestat interes pentru producerea de proteine microbiene pe hidrocarburi. Cercetările specialiștilor de la această firmă au avut ca punct de plecare deparafinarea petrolului care se realiza într-un bioreactor cu ajutorul unei levuri, Candida, în care se introducea și o sursă de azot. Procesul era condus în mod neseptic, iar după faza de creștere activă levura era recoltată, resturile petroliere precum și unele lipide erau îndepărtate obținîndu-se o biomasă concentrată vitamino-proteic. Utilizarea acesteia în furajarea animalelor a dat rezultate neașteptate. Toate acestea au făcut ca la sfîrșitul anului 1975 să intre în funcțiune la Sarroche în Sardinia prima uzină de mare capacitate a firmei British Petroleum. Ulterior aceasta s-a asociat cu o companie italiană formînd asociația Italprotein, care producea în acea perioadă aproximativ 100.000 t/an.

Tot în anul 1975 Japonia, Sooția, Franța precum și alte țări din lume au arătat interes pentru producerea de proteine pe hidrocarburi, însă criza petrolului care se instalase destul de evident în perioada anilor 78 - 80 face ca multe dintre aceste țări să aibă rezerve față de viitorul unor astfel de biotehnologii.

Cele mai multe dintre biotehnologiile puse la punct în lume, aveau ca producător levurile, a căror randament de producție nu satisfăcea întotdeauna. Aceasta a fost un motiv în plus în limitarea producerii de proteine pe hidrocarburi. In afară de acestea, se constată că hidrocarburile nu ar fi cel mai pretabil substrat pentru producerea de proteine microbiene. Ele prezintă o serie de dezavantaje care au redus și mai mult interesul producătorilor. Cele mai notabile dezavantaje sînt:

1) necesarul de oxigen pentru desfășurarea procesului este mare. Procesele de oxidare a hidrocarburilor impun un consum energetic superior și deci și procese de oxidoreducere complicate;

2) transferul de masă de la substrat la celulă este mic;

3) cantitatea de căldură rezultată din proces este mare ce creşte consumul de agent termic pentru răcirea bioreactoarelor, procesul devenind nerentabil;

4) produsul finit conţine resturi de hidrocarburi ce limitează utilizarea sa datorită efectelor cancerigene a acestuia.

Toate acestea au condus la orientarea producătorilor spre alte substrate de biosinteză proteică mai eficiente şi mai pure.

10.2. Proteine microbiene obţinute din alcooli

Deşi în ultimii 20 ani s-a constatat creşterea interesului în dezvoltarea unor procese la scară mare pentru producerea de proteine microbiene, totuşi dintre toate substanţele testate multe n-au putut asigura o extindere a proceselor şi siguranţă în producţie.

In perioada anilor '80 noi speranţe au oferit alcoolii, în special alcoolul metilic şi etilic. Aceasta a făcut ca multe firme din lume să se orienteze spre aceştia şi să-şi dezvolte noi biotehnologii de producere a proteinelor microbiene (SCP). Astfel, în Germania firma Hoechst AG şi în Anglia societatea Imperial Chemical Industries (ICI) produc proteine microbiene atît cu ajutorul bacteriilor cît şi levurilor, pe metanol.

In Japonia, Mitsubishi Caz Chemical Co. dezvoltă procese pilot industrial de obţinere a proteinelor de natură bacteriană cu Pseudomonas AM_1 şi Protaminobacter ruber precum şi cu levuri care tolerează temperaturi în jur de 40°C. Tot în Japonia, Mitsubishi Petrochemical Co. au investigat atît posibilităţile de obţinere a proteinelor microbiene cu bacterii şi levuri pe metanol în sisteme de cultivare continui şi discontinui. Un astfel de procese prin care se produc aproximativ 500 t/an proteine bacteriene funcţionează la nivel de pilot industrial.

Utilizarea metanolului ca substrat de biosinteză în obţinerea de proteine microbiene este justificată din mai multe considerente:

1) metanolul este perfect miscibil cu apa;

2) metabolizarea lui nu necesită consumuri suplimentare de oxigen;

3) nu lasă reziduuri în produsul finit;

4) poate fi obţinut în stare pură la preţuri relativ scăzute;

5) din procesele de biosinteză rezultă puţină căldură ce face ca cheltuielile de răcire a bioreactoarelor să fie reduse;

6) nu există riscul de explozie ca urmare a amestecului oxigen-metanol.

In afară de toate acestea, mediile de cultură au o compoziţie chimică simplă, cele mai multe sînt medii sintetice cu componenţi minerali ieftini şi uşor de obţinut.

Testele de nutriţie efectuate asupra produsului finit, precum şi cele de toxicitate indică utilizarea acestei proteine fără rezerve. Ea se poate folosi cu succes în furajarea animalelor de carne în proporţie de 10 - 15 % din raţia furajeră.

Etanolul ca sursă de carbon ar putea fi folosit de cîteva bacterii şi drojdii în vederea producerii de proteine microbiene (SCP). In general, etanolul prezintă şi el o serie de avantaje care îl face utilizabil în astfel de procese, însă preţul său de cost în continuă creştere şi utilizarea în alte domenii industriale limitează folosirea sa în obţinerea de proteine microbiene. Cu toate acestea s-au pus la punct unele procedee de obţinere a proteinelor pe etanol. Astfel, firma Amoco Foods Co , produce cu Candida utilis anual 5.000 t . Cultivarea acestui microorganism se face într-o instalaţie de cultivare continuă, concentraţia etanolului păstrîndu-se la 200 ppm. In finalul procesului se obţine o concentraţie de 6-7 g/l de celule uscate.

Sînt cunoscute în prezent şi alte procedee de obţinere a proteinelor microbiene pe etanol. Ele au ca producători fie bacterii fie levuri. Cele mai cunoscute sînt cele care au ca producători pe: Acinetobacter calcoaceticus, Candida acidothermophilus, Candida ethanothermophilus, Candida utilis, Hansenula polimorfa, sau specii de Rhodotorula.

10.3. Producerea de proteine microbiene pe alte substrate

In afară de substratele devenite deja „tradiţionale" o gamă largă de alte substrate ar putea fi folosite în obţinerea de proteine microbiene (SCP). Printre acestea ar putea fi enumerate: celuloza, deşeurile celulozice, melasele, leşiile sulfitice, lactoserul, apele industriale din industria cărnii, etc.

Obţinerea de proteine microbiene pe astfel de substrate se poate realiza prin cultivarea bacteriilor, levurilor şi fungilor.

Un interes deosebit cel puţin în ultimul timp l-a trezit

celuloza şi deşeurile celulozice. Este cunoscut că mai mult de jumătate din masa vegetală rezultată din agricultură şi silvicultură este un produs secundar care se foloseşte parţial sau se aruncă. Această imensă sursă de materie primă ar putea fi folosită în procese microbiene de conversie. Conversia ei s-ar putea face cu succes la proteine microbiene sau alte substanţe şi combustibili de mare interes.

Conversia hidrolitică a celulozei sau materialelor celulozice cu ajutorul microorganismelor conduce la obţinerea de glucoză care la rîndul său poate să devină materie primă de bază în alte procese de obţinere a proteinelor microbiene furajere, a etanolului, acidului acetic, furfurolului, hidrogenului, etc.

Melasele ca subproduse rezultate de la fabricarea zahărului s-au dovedit a fi un substrat pretabil obţinerii de proteine microbiene. Conţinutul lor ridicat în zaharoză, care este în medie de 48-50 %, rafinoză 1 %, glucoză şi fructoză 1 %, face din ele unul dintre cele mai complete surse de carbon necesare creşterii multor categorii de microorganisme. In plus, ele conţin unii factori de creştere cum ar fi: biotina, acidul pantotenic, tiamina, săruri minerale şi aminoacizi, toate la un loc reprezentînd substrate de cultură excelente pentru microorganisme.

Rezultate remarcabile de producere a proteinelor microbiene s-au obţinut prin cultivarea pe melase a unor specii de levuri, cum ar fi Candida utilis, Candida tropicalis, Candida pelliculosa, etc. Produsul obţinut prezintă o înaltă valoare nutritivă şi a dat rezultate remarcabile în furajarea animalelor.

Cu toate acestea, utilizarea melaselor în obţinerea de proteine microbiene este limitată datorită faptului că materia primă nu poate fi furnizată firmelor producătoare pe tot parcursul anului.

Leşiile sulfitice sînt şi ele materii prime pretabile în obţinerea de proteine microbiene. Datorită conţinutului lor în substanţe reducătoare, care este de aproximativ 2,4 % şi prin adăugarea de alţi ingredienţi se pot obţine adevărate medii de cultură pentru microorganisme. Prin cultivarea unor specii de Candida pe astfel de medii de cultură s-a obţinut o biomasă concentrată proteic bine acceptată de animale.

In SUA şi Finlanda funcţionează uzine de mare capacitate de producere a proteinelor microbiene pe astfel de substrate. De exemplu, în Finlanda se produc anual 10.000 t/an prin cultivarea

unei ciuperci (Paecilomyces), iar în SUA se produc peste 50.000 t/an prin cultivarea unor levuri.

Lactoserul sau zerul este un subprodus rezultat de la fabricarea brînzeturilor cu un conţinut remarcabil în lactoză şi săruri minerale, care dacă se suplimentează cu săruri de amoni şi fosfor poate să devină un excelent mediu pentru cultivarea unor specii de levuri în vederea obţinerii de proteine microbiene.

Rezultate bune s-au obţinut prin cultivarea unor tulpini de Saccharomyces şi Candida. Proteina obţinută se poate folosi atît în furajarea animalelor cît şi la prepararea de alimente de uz uman.

In Franţa, funcţiona în anul 1979 trei firme care produceau 6.000 t/an proteine microbiene cu utilizarea atît în furajarea animalelor cît şi în alimentaţia omului, iar în anul 1983 s-a proiectat şi s-a construit încă o firmă producătoare de 10.000 t/an.

10.4. Valoarea nutritivă şi testarea eficienţei biologice a proteinei microbien

Proteina microbiană (SCP) spre deosebire de alte produse similare provenit de la animale sau plante, prezintă o compoziţie chimică relativ constantă, dat fiind faptul că procesele biotehnologice prin care se obţine sînt sub un strict control, nefiind dependente de factorii de mediu.

ICI şi BP au arătat că produsele proteice microbiene depăşesc calitativ produsele similare obţinute de la plante şi animale, valoarea lor nutritivă fiind în cele mai multe cazuri superioară acestora.

Conţinutul lor în proteine, compoziţia echilibrată în aminoacizi, conţinutul în vitamine şi alte substanţe nutritive face din acestea unul dintre furajele cele mai complete.

Mulţi specialişti apreciază că aceste proteine ar trebui făcute acceptabile şi pentru consumul uman. Iniţial s-a apreciat că acest lucru n-ar fi posibil datorită unor bariere comportamentale şi psihologice, însă recent multe dintre produsele proteice microbiene sînt componente a unor produse alimentare: supe, salamuri sau alte preparate. Urmărirea efectelor lor o perioadă îndepărtată a arătat că ele nu prezintă pericol pentru alimentaţia umană şi nu produc modificări nutriţionale sau digestive.

Orice produs nou fie el de natură animală, vegetală sau microbiană înainte de a fi introdus în alimentaţie trebuie testat din punct de vedere nutriţional şi toxicologic.

- Testarea efectelor nutritive se face prin determinarea următorilor indici: valoarea biologică, coeficientul de digistibilitate şi coeficientul de eficienţă proteică.

- Testarea efectelor toxice este deosebit de importantă deoarece orice produs poate să prezintă o serie de substanţe cu efecte alergice sau cancerigene care limitează sau înlătură utilizarea sa în alimentaţie. Deşi aceste efecte sînt mai puţin evidente la animale, totuşi valorile testelor de toxicitate trebuie să se dispună sub limita minimă admisă.

Toate aceste teste au şi rolul de a indica procentul în care se poate folosi un astfel de produs în alimentaţie sau furajare.

11. Epurarea biologică a apelor reziduale

Dezvoltarea extensivă a industriei a condus la un consum exagerat de apă şi în paralel cu acesta la o creştere nepermis de mare a apelor uzate.

Dar nu numai marea industrie a dus la poluarea apelor ci şi agricultura, care prin marele sale complexe de creştere a animalelor a contaminat multe ape curgătoare transformîndu-le în adevărate cimitire fluide.

Este cunoscut că într-o apă conţinutul de oxigen solvit este menţinut printr-un proces de aerare naturală care este continuu reînnoit prin schimburile ce au loc între cele două faze: aer şi apă. In condiţiile în care o apă este intens poluată, deci are o încărcătură organică mare, oxigenul solvit este consumat de flora microbiană ce fac ca aceasta să crească cantitativ şi la un moment dat apa nemaiputîndu-i satisface necesităţile în oxigen, moare. Moartea microorganismelor aerobe, căci despre această este vorba, conduce la creşterea concentraţiei efluienţilor poluanţi.

In cazul în care apele sînt poluate cu substanţe industriale toxice în cantităţi ce depăşesc limitele biodegradabilităţii, atunci nu se mai poate forma o microfloră specifică, solvirea oxigenului este mult scăzută şi efectele poluante ale apei vor creşte.

Putem spune deci că fiecare bazin acvatic posedă o anumită capacitate în asimilarea reziduurilor organice sau chimice cu

înalt grad de poluare. Dacă aceste limite sînt atinse atunci macro- şi microflora este distrusă mai mult sau mai puţin rapid, permiţînd instalarea unei microflore anaerobe sau patogene cu efecte nedorite sau poate conduce la creşterea conţinutului unor substanţe toxice cu efecte nocive grave pentru oceanul planetar.

In general, echilibrul unui bazin acvatic este condiţionat de existenţa unor factori naturali şi de mediu printre care putem aminti:

1) Gradul de aerare, aceasta reprezentînd diferenţa dintre oxigenul consumat de microorganisme şi oxigenul provenit fie din aer, fie din fotosinteza plantelor acvatice.

2) Conţinutul în substanţe organice de care depinde numărul de microorganisme biodegradative şi viaţa acestora.

3) Natura şi concentraţia elementelor minerale solvite. Cu cît gradul de toxicitate a acestora este mai mare, cu atît microflora va fi distrusă cresînd gradul de poluare.

4) Valoarea pH.

5) Temperatura este factor important în desfăşurarea proceselor de biodegradare.

Poluanţii bazinelor acvatice sînt foarte diferiţi şi ei pot fi întîlniţi în [illegible] sub diferite forme:

1) sub formă de substanţe solubile alcătuite din hidraţi de carbon şi proteine. Aceste substanţe au efecte benefice asupra microflorei, favorizînd epurarea apei. Insă, dacă în anumite condiţii conţinutul acestor substanţe creşte în mod exagerat, ele pot conduce la distrugerea organismelor vii din apă;

2) sub formă de substanţe insolubile; celuloză, lignină, restul de produse animaliere de la abatoare, resturi menajere, etc. Toate acestea sînt mai greu biodegradabile, necesitînd o microfloră specifică;

3) acizi şi baze rezultate din procesele industriale. Acestea conduc în general la alterarea echilibrului ecologic a apei prin distrugerea unor categorii microbiene;

4) substanţe toxice minerale, sărurile metalelor grele (Cr, Ag, Sb, etc.), anhidridele, cianurile, fenolii, derivaţii anilinici, pesticide, etc. Toate acestea au efecte poluante alarmante, distrugînd în mare parte microflora bazinului. Epurarea unor astfel de ape necesitînd tehnici speciale în care tratamentele chimice sînt indispensabile ;

5) detergenţi şi apele rezultate de la fabricarea lor.

Aprecierea calităţii unei ape se face prin determinarea consumului chimic de oxigen (CBO_5).

CBO_5 reprezintă cantitatea de oxigen pe care o consumă microorganismele dintr-o apă bogată în substanţe organice în timp de 5 zile la 20°C. In apa unui rîu nepoluat CBO_5 are valori de aproximativ 0,001 g/l, pe cînd în apa unui rîu poluat valoarea sa creşte la 0,010 g/l. In apele cu resturi menajere CBO_5 este de 72 g/l, iar în resturile menajere umane valoarea sa este de 76 g/l. In astfel de ape cu înaltă grad de poluare, datorită unei slabe solubilizări a oxigenului, reoxigenarea se face foarte lent.

Reoxigenarea unei ape se poate determina cu următoarea formulă:

$$K = \frac{r}{\left|C_{O_2}\right.}$$

unde: K = factorul de reoxigenare;
r = viteza de oxigenare (mg/l/zi);
$\left|C_{O_2}\right.$ = viteza de consum a oxigenului de către microorganisme şi organismele acvatice.

Valoarea K ar putea reda raportul dintre gradul de aerare şi viteza de solvire a oxigenului în apă. Valorile sale sînt diferite de la bazin la bazin. De exemplu, în bălţi K = 0,5 - 1 mg/l/zi; în iazuri K = 1 - 1,5 mg/l/zi; în rîurile lente K = = 1,5 - 2 mg/l/zi; iar în rîurile cu curs rapid K = 3-5 mg/l/zi.

11.1. Metoda de epurare a apelor uzate

Există mai multe metode de epurare a apelor uzate:

1) Metode de epurare fizică;
2) Metode de epurare chimică;
3) Metode de epurare microbiologică;
4) Metode de epurare combinate.

- Metoda de epurare microbiologică

Epurarea microbiologică se realizează cu ajutorul microorganismelor aerobe sau anaerobe.

In cazul în care epurarea se face cu microorganismele aerobe, îndepărtarea poluanţilor se face în proporţie de 70 %. Epurarea cu microorganisme anaerobe nu dă rezultate suficient de mulţumitoare deoarece din proces rezultă gaz metan şi CO_2, care pot deveni ei la rîndul lor poluanţi, iar conţinutul de oxigen nu se îmbunătăţeşte.

Epurarea aerobă se poate realiza prin mai multe tehnici. Dintre acestea cea mai utilizată în prezent este tehnica „filtrului biologic". Această tehnică constă în trecerea apei uzate după o prealabilă decantare printr-un „filtru biologic", care nu este altceva decît un bazin în care pe o rețea metalică se dispun diferite materiale filtrante: piatră, cox, zgură, etc. în așa fel încît apa să se prelingă pe ele. Acest material poros are rolul de a mări suprafața de contact, favorizînd reținerea microflorei din apă, în special a formelor bacteriene capsulate care la rîndul lor vor determina reținerea altor forme microbiene realizîndu-se un adevărat filtru. Prin trecerea apei prin el microorganismele din apă vor fi reținute realizîndu-se totodată și descompunerea substanțelor organice și în paralel și epurarea apei. Această tehnică se aplică la apele cu un grad mic de poluare.

In cazul apelor foarte poluate microflora din filtru nu reușește să desăvîrșească epurarea. Pentru a crește viteza de epurare în acest caz se adaugă la sistem, un mecanism de aerare, accelerînd în felul acesta creșterea procesului de multiplicare și viteza de consum a substanțelor de către microflora microbiană.

Există și alte tehnici de epurare a apelor uzate prin intermediul cărora se mărește mult gradul de epurare a lor. O tehnică larg utilizată în prezent este tehnica nămolului activ. Această tehnică prevede obținerea unui nămol cu o încărcătură microbiană specifică care este în măsură să epureze apele industriale cu grade diferite de poluare.

Nămolul activ se obține într-un bazin special, el putînd fi folosit și la inocularea altor bazine. Toate aceste bazine necesită o continuă aerare ce favorizează formarea de flocoane de microorganisme cu rol important în epurare. Formarea lor se datorează existenței în microflora nămolului activ a unor bacterii capsulate și a unor microorganisme care au capacitatea de a se aglomera în condițiile în care elementele nutritive din mediu se diminuează. Diminuarea lor indică epurarea unor poluanți și scăderea gradului de poluare a apei.

După ce apa a fost epurată este trecută într-un decantor unde se separă de flocoane, introducîndu-se în circuitul natural.

Tehnica de epurare cu ajutorul nămolului activ este foarte rentabilă, dar funcționarea continuă a sistemului face ca la un moment în sistem să se acumuleze masiv nămol, devenind chiar

el un factor poluant. Pentru a se evita acest lucru, nămolul rezultat este supus unui proces anaerob de transformare pe care cale se poate obţine biogaz ca combustibil, iar reziduurile rezultate se pot folosi ca îngrăşământ în agricultură sau pot fi incinerate. Cenuşa de incinerare se poate folosi la obţinerea unor materiale de construcţie. In felul acesta efectele poluante sînt înlăturate.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B I B L I O G R A F I E

1. Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. - Biochemical Engineering, V. I, II, Second Edition, Ed. Acad. Press, Inc., 1973.

2. Anghel I. - Inginerie genetică, Litografiat Universitatea Bucureşti, 1988.

3. Anghel I., Herlea Victoria, Toma N. - Drojdiile. Ed. Acad. RSR, Bucureşti, 1984.

4. Anghel I. (coordonatorul lucrării) - Biologia şi tehnologia drojdiilor, V. I şi II, Ed. tehnică, Bucureşti, 1989, 1991.

5. Antohi St., Gavrilă L. - Progrese în genetica moleculară. Ed. ştiinţifică şi enciclopedică, Bucureşti, 1981.

6. Bull A.T., Ellwood D.C., Ratledge C. - Microbial Technology: current state, Future Prospects, Cambridge University Press, London, New York, Melbourne, 1979.

7. Crabtree K., Hinsdill R.D. - Fundamental Experiment in Microbiology, W.B. Saunders Company. Philadelphia. London, Toronto, 1974.

8. Davis P. - Single Cell Protein, Academic Press. London. New York. San Francisco, 1974.

9. Deacon J.W. - Introduction to Modern Mycology, Ed. Blackwell Scientifice Publications, Oxford. London. Edinburgh. Boston. Melbourne, 1980.

10. Demain A.L. - Industrial Microbiology, Science, Washington, V. 214, p. 987 - 995, 1987.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. Evans W.C. - Biochemistry of the Bacterial Catabolism of Aromatic Compunds in Anaerobic Envizonments, Nature, London, v. 270, 5632, p- 17-22, 1988.

12. Fechter A. - Biotschnology. Microbial Fundamentals. V.I, 1981.

13. Kayser E. - Microbiologie appliquée, Paris. Librairie J.B.Baillière et Fii, 1921.

14. Kwapinski J.B.G. - Molecular Microbiology - John Wiley § Sons, New York. London. Sydney. Toronto, 1974.

15. Generés L. - Biologie cellulaire. La cellule microbiologie, Ed. Dunod Université, V.1, 1979.

16. Leclerc H., Buttiaux R., Guillaume J., Wattre P. - Microbiologie appliquée, Ed. Doin, Paris, 1977.

17. Lehman I.R. - DNA Ligase: Structure, Mechanism and Function, Science, V.186, p.790, 1974.

18. Laskin A., Lechevalier H. - Handbook of Microbiology, V. 1-4, Ed CRC Press Inc., 1974.

19. Moţoc D. - Microbiologie industrială, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1962.

20. Müller G. - Biologia solului, Ed.Agro-Silvică, Bucureşti, 1968.

21. Oniscu C. - Tehnologia proceselor de biosinteză. Ed. Tehnică Bucureşti, 1978.

22. Piatkin K., Krivoshein Yu - Microbiologia, Editorial „MIR" Moocu, 1989.

23. Popa L., Repanovici Rodica - Tehnologia ADN recombinat (Ingineria genetică). Ed. ştiinţifică şi enciclopedică Bucureşti, 1982.

24. Raicu P., Stoian Viorica, Nicolaescu Măriuca - Mutaţiile şi evoluţia. Ed. Enciclopedică, Bucureşti, 1974.

25. Raicu P. - Genetice, Ed. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1980.

26. Rehm H.J. - Einführung in die industrielle Mikrobiologie, Ed. Springer - Verlag Berlin - Heidelberg, New York, 1971.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

27. Rioica J. - Methods in Microbiology, V.II, Ed. by Norris J.R., Ribbons D.W., Acad.Press, London. New York, 1970.

28. Sasson A. - Biotehnologiile - sfidare şi promisiuni, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1988.

29. Scragg A.B. - Biotechnology for Engineers. Biological Systems in Technological Processes. Ed. Ellis Horwod Limited, John Wiley-Sons, New York. Chichester. Drisbam. Toronto, 1988.

30. Schleger H.G., Lafferty R.M. - Advances in Biochdmical Engineering. V.1, 1972.

31. Scott C.D. - Imobilized Cells: a review of recent literature. Enzyme Microbial Technology, 9, p. 66 - 73, 1987.

32. Skinner F.A., Lovelook D.W. - Identification Methods for Microbiologists, Second Edition, Acad. Press, 1979.

33. Topală D.K. - Microbiologie generală. V.I şi II, Litografiat, Univ. „Al.I.Cuza" Iaşi, 1978.

34. Zarnea G., Mencinispschi Gh., Brăgărea St. - Bioingineria preparatelor enzimetice microbiene, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1980.

35. Zarnea G. - Tratat de microbiologie generală, V.I, II şi III, Ed.Acad. RSR, Bucureşti, 1984-1990.

36. Viesturs U., Smite I., Zhil'Evich A.V. - Biotehnologie. Agenţi biotehnologici, tehnologie, aparatură. Ed. Ceres, Bucureşti,1991 (Trad. din l.rusă).

37. Watson J.D. - Biologie moleculară a genei, Ed.ştiinţifică Bucureşti, 1974.

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
Cota veche 15
Preţul lei

BCU IAŞI / CENTRU VECHI UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lei 2700